



Universidade Nova de Lisboa

**Resistência a insecticidas em *Anopheles gambiae* s.l. na
região de Luanda, Angola**

Arlete Dina Albano Troco

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA
MÉDICA

SETEMBRO DE 2012



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Resistência a insecticidas em *Anopheles gambiae* s.l. na região
de Luanda, Angola**

Arlete Dina Albano Troco

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Orientador:

Prof. Doutor João Pinto (UEIPM/IHMT/UNL)

Co-orientador:

Prof. Doutor Filomeno Fortes (PNM, Ministério da Saúde de Angola)

SETEMBRO DE 2012

A minha filha, aos meus irmãos e ao meu marido por tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela gratuidade da vida e por estar comigo em todos os momentos da minha formação.

Ao meu Orientador, Prof. Doutor João Pinto, pela disponibilidade incondicional, rigor, apoio prestado ao longo da elaboração deste trabalho e principalmente pela sua amizade e carinho.

Ao meu co-orientador, Prof. Doutor Filomeno Fortes, por me ter dado a oportunidade de fazer este mestrado e por todo apoio prestado ao longo do mesmo.

O meu agradecimento especial ao Engenheiro José Luís Vicente, pela incapacidade de dizer “não”, pelo apoio paciente, extrema disponibilidade e sobretudo pela experiência e grande suporte laboratorial.

Aos Professores, colegas do mestrado e ao pessoal da unidade de entomologia pelo convívio harmonioso e pela amizade.

Ao Dr. Cani Pedro, Entomologista-chefe do Programa Nacional de Controle da Malária (Angola), e aos técnicos de entomologia do Programa (Sr. Zambote, Sr. Bunga, Sr. André) pelo apoio prestado na realização das colheitas entomológicas em Luanda.

Aos colegas do Programa da malária, especialmente a Dra. Antónia Ribeiro pelo carinho, apoio, atenção e sempre pronta intervenção no concernente a logística durante a minha estadia em Lisboa.

Aos meus irmãos (João, Vasco, Albano e Sérgio) e ao meu marido (Miguel) pelo carinho, apoio incondicional nos momentos mais difíceis e incentivo dado na conclusão deste almejado objectivo.

Por último mas nem por isso menos importante, gostaria de expressar a todos que, directa ou indirectamente, contribuíram para a materialização deste trabalho (Dra. Maria Imaculada) a minha eterna gratidão.

Este trabalho foi financiado pelo projecto *TDR Network on Insecticide Resistance in African Malaria Vectors*, do Programa UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; e pelo Programa Nacional de Controle da Malária, Ministério da Saúde de Angola, através do Projecto HAMSET.

RESUMO

Resistência a insecticidas em *Anopheles gambiae* s.l. na região de Luanda, Angola

Arlete Dina Albano Troco

Em Angola, a malária é a principal causa de morbilidade e de mortalidade infantil. O controlo de vectores com recurso aos insecticidas representa uma parte importante da estratégia actual para a prevenção da doença. Em *Anopheles gambiae* s.s., principal vector de malária em África, estão identificadas duas mutações pontuais no gene que codifica os canais de sódio das membranas das células do sistema nervoso, conferindo resistência *knockdown* (*kdr*) aos insecticidas piretróides e ao DDT. Também se encontra descrita para esta espécie uma mutação no gene acetilcolinesterase-1 (*ace-1*), associada à resistência a carbamatos e organofosfatos. Este trabalho teve como principal objectivo avaliar o nível de resistência aos insecticidas em *An. gambiae* da província de Luanda, Angola e determinar a frequência destas mutações.

Foram realizadas colheitas entomológicas em 2009 e 2010, através da prospeção de criadouros larvares. Os insectos capturados foram criados até a emergência do adulto e sujeitos a ensaios de susceptibilidade a insecticidas, através de testes da OMS. A identificação de espécies e formas moleculares do complexo *An. gambiae*, bem como a pesquisa de mutações no gene *ace-1* foram feitas por PCR-RFLP. A pesquisa de mutações no gene *kdr* foi realizada por PIRA-PCR. Amostras seleccionadas de mosquitos (incluindo uma amostra proveniente de uma colheita de adultos) foram ainda genotipadas para 11 *loci* microssatélites.

Os níveis de resistência para a permetrina, DDT e λ -cicalotrina foram elevados, com taxas de mortalidade inferiores a 70% em ambos os anos. Em contraste, as taxas de mortalidade foram sempre acima de 98% para bendiocarb e fenitrotião, indicadoras de susceptibilidade a estes insecticidas. Todas as amostras processadas foram identificadas como *An. gambiae* s.s., forma molecular M e não se observou a mutação no gene *ace-1* associada à resistência. Em ambos os anos, foi detectada apenas a mutação L1014F no locus *kdr* e a frequência do alelo mutante (TTT) foi bastante elevada. Em 2009, observou-se uma associação entre genótipos homozigóticos para o alelo 1014F e o fenótipo resistente, para os insecticidas piretróides e para o DDT.

O polimorfismo dos *loci* microssatélites analisados foi elevado, com a riqueza alélica a variar entre 5 (45C1) e 20 (H128) e a heterozigotia esperada entre 0,529 (H577) e 0,862 (H249). A análise genética não revelou um grau de parentesco entre os indivíduos que constituíram as amostras estudadas. Este resultado sugere que os elevados níveis de resistência observados não foram influenciados pelo método de colheita de mosquitos que, em certas condições, poderia contribuir para a amostragem de indivíduos aparentados.

PALAVRAS-CHAVE: *Anopheles gambiae*, resistência a insecticidas, genes *kdr*, microssatélites.

ABSTRACT

A study on *Anopheles gambiae* s.l insecticide resistance in the city of Luanda, Angola.

Arlete Dina Albano Troco

In Angola malaria is still one of the leading causes of child morbidity and mortality. Vector control depends mainly on insecticides which constitutes an important part of the national strategy to prevent and control malaria transmission. In *Anopheles gambiae* s.s., the main malaria vector in sub-saharan Africa, , two point mutations have been identified in the gene encoding the sodium channels in cells of the nervous system. These mutations confer a knockdown resistance (*Kdr*) to pyrethroids and DDT. A mutation in the acetylcholinesterase-1 gene (*ace-1*), associated with resistance to carbamate and organophosphate insecticides, was also described for this species. The aims of this study were to evaluate insecticide resistance levels in *A. gambiae* from Luanda, Angola and determine the frequency of these mutations.

Larval sampling was carried out in breeding sites between in 2009 and 2010. Immature mosquitoes were allowed to reach the adult stage and subsequently used in WHO standardized insecticide susceptibility assays. *A. gambiae* species identification and mutation detection in the *ace-1* gene was carried out by PCR-RFLP. Mutations in the *kdr* gene were identified by PIRA-PCR. In addition, selected mosquito samples (including a sample of wild caught adults) were genotyped for 11 microsatellites.

The WHO insecticide susceptibility assays have shown high levels of resistance to permethrin, DDT and λ -cyafluthrin, with mortality rates below 70% in both years. In contrast, the rates of mortality were high for bendiocarb and fenitrothion, indicating susceptibility to these insecticides. All specimens were identified as *A. gambiae* s.s M-form. The resistance-associated mutation at *ace-1* was not detected. In both years, only the L1014F mutation was found at the *kdr* locus and the frequency of the mutant allele (TTT) was very high. In 2009, an association between homozygotic genotypes for the mutant allele and the resistant phenotype for pyrethroids and DDT was observed.

Polymorphism at microsatellite loci was high, with allelic richness varying between 5 (45C1) and 20 (H128) and expected heterozygosity between 0,529 (H577) and 0,862 (H249). Genetic analysis did not reveal a degree of relatedness between the individuals that constituted the samples studied. Taken together, these results suggest that the high levels of resistance observed were not influenced by the sampling method used, which in certain conditions can contribute to the sampling of related individuals.

Key words: *Anopheles gambiae*, insecticide resistance, *kdr* genes and microsatellites.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A malária: o problema	2
1.1.1. Parasita da malária e ciclo de vida	3
1.2. O vector	5
1.2.1. Ciclo de vida do vector	6
1.2.2. Aspectos bioecológicos e comportamentais do vector.....	8
1.3. O complexo <i>Anopheles gambiae</i>	9
1.4. Controlo da malária	11
1.4.1. Controlo químico	12
1.5. Resistência a insecticidas.....	14
1.5.1. Resistência <i>Knockdown</i>	15
1.5.2. Resistência <i>ACE-1</i>	16
1.5.3. Determinação de resistências no terreno	17
1.6. Malária em Angola	18
1.7. Objectivos do estudo	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1. Caracterização da área de estudo.....	23
2.2. Material biológico.....	23
2.3. Testes de susceptibilidade dos vectores da malária.....	23
2.4. Extracção de DNA.....	25
2.4.1. Identificação molecular de espécies e formas moleculares de <i>An. gambiae s.l.</i>	26
2.4.2. Restrição enzimática do produto amplificado.....	28
2.4.3. Preparação das amostras e condições de electroforese.....	28
2.4.4. PCR para detecção da mutação G119S no gene <i>ACE-1</i> em <i>An. gambiae s.s.</i>	29

2.4.5. Digestão enzimática.....	29
2.4.6. Preparação das amostras e condições de electroforese.....	30
2.4.7. Genotipagem para detecção de mutações <i>kdr</i> em <i>An. gambiae</i> <i>s.s.</i>	30
2.4.7.1. Detecção da mutação L1014S (TTA-TCA).....	31
2.4.7.2. Reacção de restrição enzimática.....	32
2.4.7.3. Detecção da mutação L1014F (TTA-TTT).....	32
2.4.7.4. Reacção de restrição enzimática.....	33
2.4.7.5. Preparação das amostras e condições de electroforese.....	33
2.5. Genotipagem de Microssatélites.....	344
2.5.1. Reacção de PCR.....	355
2.5.2. Visualização do produto de PCR.....	366
2.5.3. Análise do tamanho de fragmentos.....	366
2.5.4. Análise dos dados genéticos.....	377
3. RESULTADOS.....	40
3.1. Testes de resistência a insecticidas.....	41
3.2. Identificação de espécies e formas do complexo <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	42
3.2.1. Pesquisa de mutações no gene <i>ACE-1</i>	42
3.2.2. Pesquisa de mutações no gene <i>kdr</i>	43
3.3. Análise de parentesco com base em microssatélites	44
4. DISCUSSÃO.....	48
4.1. Níveis de resistência aos insecticidas	49
4.2. Identificação molecular do complexo <i>Anopheles gambiae</i>	50
4.3. Base genética da resistência	51
4.4. Análise de parentesco	53
5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ÍNDICE DE FIGURAS.....	77
ÍNDICE DE TABELAS.....	78
ANEXOS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina de soro bovino

ddH₂O – água bidestilada

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – 3'-desoxirribonucleotídeo -5'- trifosfato

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

e.g. – *exempli gratia* – por exemplo

FAM – *6-carboxyfluorescein* (6-carboxifluoresceína)

H-W – Hardy-Weinberg

He – heterozigotia esperada

HEX – *hexachlorofluorescein* (Hexaclorofluoresceína)

i.e. – *id est* – isto é

IGS – *Intergenic Spacer* (Espaçador intergénico)

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS – *Internal Transcribed Spacer* (Espaçador interno transcrito)

Kdr – *Knockdown resistance* (Resistência Knockdown)

LLIN – *Long Lasting Insecticidal Net* (Redes mosquiteiras impregnadas de longa duração)

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

N – Tamanho da amostra

NED – *N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride* (N-1-diidrocloreto de naftiletilenodiamina)

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reacção em cadeia da Polimerase)

PNCM – Programa Nacional de Controlo da Malária

PIRA - PCR – *Primer Introduced Restriction Analysis*

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*

rDNA – DNA Ribossomal

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição)

SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms* (Polimorfismos de base única)

SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

TBE – Tris/Borato/EDTA (solução tampão constituída por base Tris, ácido bórico e EDTA)

TE – Tampão de Eluição composto por Tris-EDTA

U – Unidade de enzima

UEM – Unidade de Entomologia Médica

UNL – Universidade Nova de Lisboa

UV – Ultra Violeta

1. INTRODUÇÃO

1.1. A malária: o problema

A malária é uma doença parasitária que tem como agentes etiológicos protozoários do género *Plasmodium*, sendo endémica em 106 países (WHO, 2011). Durante a última década, a incidência e as taxas de mortalidade foram reduzidas em várias regiões do globo. De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2010, foram notificados cerca de 216 milhões de casos de malária a nível mundial. Mais de 80% dos casos e 91% das mortes foram registadas no continente Africano (WHO, 2011). Não obstante, a malária permanece como sendo um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Figura 1).

Apesar de afectar todas as faixas etárias, as principais vítimas de malária são crianças com menos de cinco anos de idade e mulheres grávidas, isto devido a baixa imunidade apresentada nestas fases particulares da vida (Korenromp, 2005).

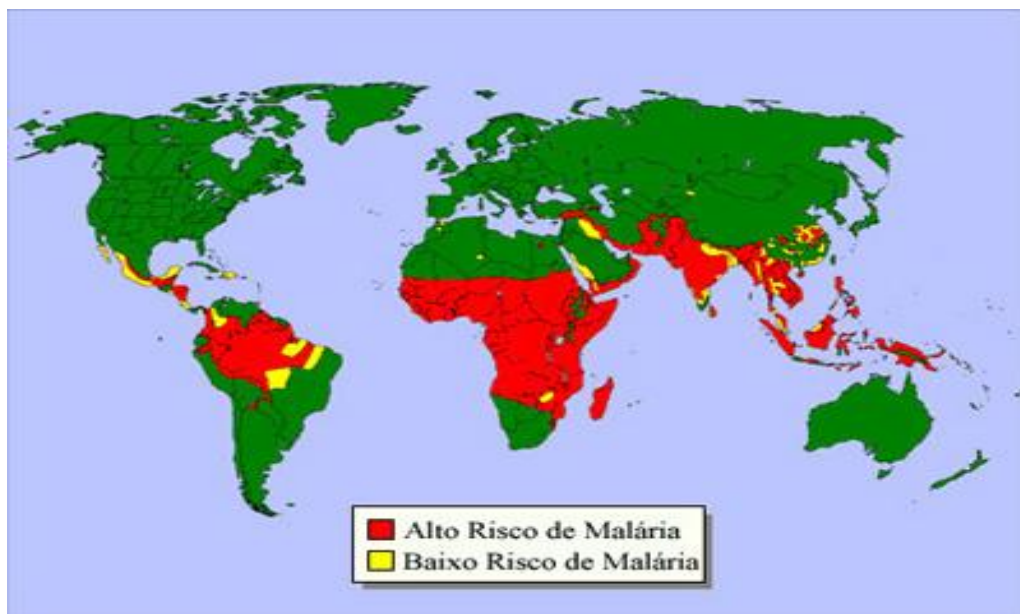


Figura 1. Distribuição da malária a nível mundial (adaptado de www.virtual.unifesp.br, acedido a 20 de Junho de 2012).

Até recentemente, o desenvolvimento urbano foi tido como um factor de redução do risco de transmissão da malária. No entanto, milhões de episódios clínicos de malária ocorrem anualmente em áreas urbanas, o que indica uma mudança da

epidemiologia da doença, (Trape *et al.*, 1992; Keiser *et al.*, 2004). Também o número de casos registados em alguns países europeus e nos Estados Unidos da América tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos, principalmente devido à imigração e ao aumento das viagens para zonas endémicas, particularmente em África (Legros & Danis, 1998; Sabatinelli *et al.*, 2001).

Com o desenvolvimento de resistências dos vectores aos insecticidas e dos parasitas aos fármacos anti-maláricos, torna-se urgente desenvolver novas estratégias para o controlo da doença. Para tal, é fundamental aprofundar os conhecimentos relacionados com a biologia, ecologia, genética dos parasitas e vectores da malária (Collins *et al.*, 2000, Phillips, 2001; Tabachnick, 2003).

1.1.1. Parasita da malária e ciclo de vida

O género *Plasmodium* inclui cerca de 200 espécies que infectam uma grande variedade de hospedeiros, incluindo anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Sermwittayawong *et al.*, 2012). Actualmente, considera-se que a malária humana é causada por cinco espécies de *Plasmodium*: *Plasmodium malariae* (Laveran 1881), *Plasmodium vivax* (Grassi and Feletti 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), *Plasmodium ovale* (Stephens 1922) e *Plasmodium knowlesi* (Sinton and Mulligan 1933), (Gilles & Warrell, 1993). A espécie *P. ovale* encontra-se subdividida em duas formas distintas designadas por *P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri* (Sutherland *et al.*, 2010). Estes parasitas apresentam diferenças na distribuição geográfica e no desenvolvimento da doença. O *P. falciparum* é a espécie responsável pelo maior número de infecções e óbitos. As espécies de *Plasmodium* que infectam humanos são transmitidas exclusivamente por mosquitos vectores do género *Anopheles*. O género *Plasmodium* apresenta a seguinte classificação sistemática (Ayala *et al.*, 1998):

Reino - Protista

Filo - Apicomplexa

Classe - Hematozoa

Ordem - Haemosporidae

Família - Plasmodiidae

Género - *Plasmodium*

O género *Plasmodium*, apresenta um ciclo de vida que se divide em duas fases distintas (Figura 2), uma sexuada, que ocorre no mosquito fêmea (hospedeiro definitivo), e outra assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado (hospedeiro intermediário), (Knell, 1991). O esporozoítio é a forma infectante do parasita, encontrado nas glândulas salivares da fêmea do mosquito do género *Anopheles*. Quando inoculado na pele humana através da picada, inicia a fase assexuada, percorrendo o sistema circulatório periférico até atingir as células do parênquima do fígado (hepatócitos). Ali desenvolvem-se e dividem-se por mitoses sucessivas, dando origem aos esquizontes pré-eritrocitários. Esta fase é denominada de ciclo exo-eritrocitário e é assintomática. Em *P. vivax* e *P. ovale* alguns parasitas não chegam a desenvolver-se de imediato, permanecendo latentes no fígado durante meses ou anos (Garnham, 1985; Wallace & Geoffrey, 2002). Estas formas designam-se por hipnozoítos, que se poderão desenvolver mais tarde dando origem a recaídas (recidivas).

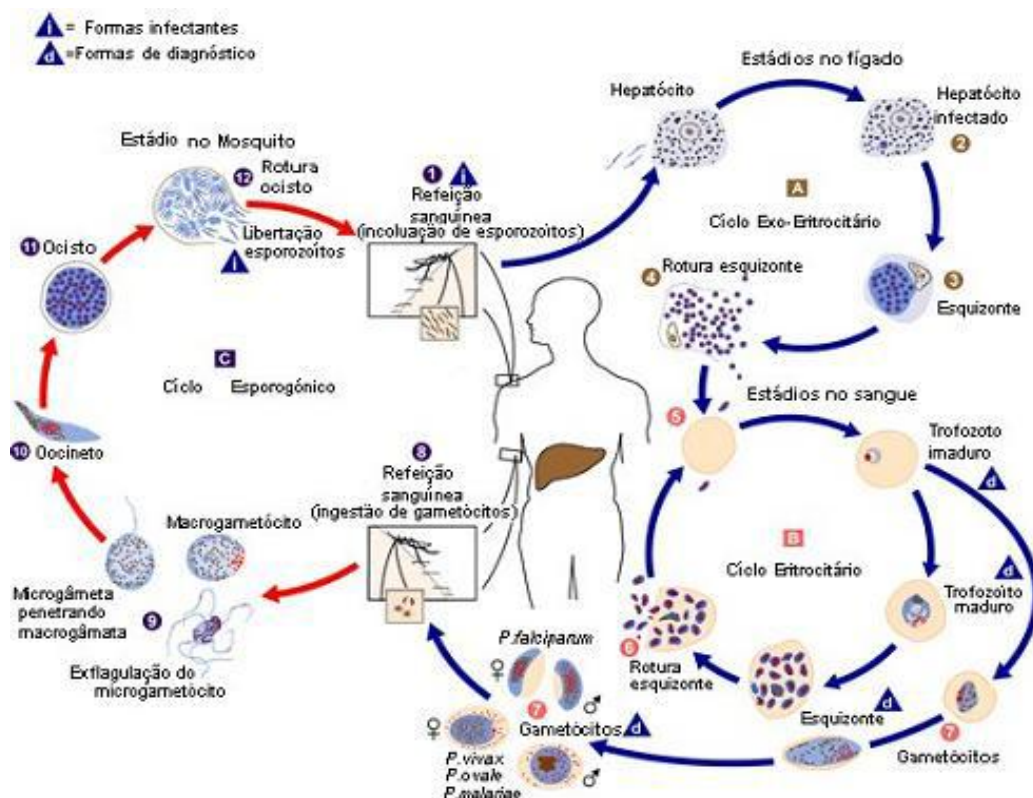


Figura 2. Ciclo de Vida do *Plasmodium* sp. (adaptado de www.cdc.gov, acessado a 18 de Abril de 2012)

Os esquizontes pré-eritrocíticos maduros rompem-se e libertam milhares de merozoítos na corrente sanguínea, invadindo os eritrócitos e diferenciando-se em trofozoítos. Os trofozoítos, após sofrerem divisão celular, dão origem a esquizontes,

rompendo em seguida os eritrócitos, libertando novos merozoítos, alguns com capacidade para parasitar novos eritrócitos reiniciando deste modo o ciclo eritrocitário do parasita, que é a fase sintomática. Outros, ainda no interior dos eritrócitos, diferenciam-se em gametócitos, as formas sexuadas do parasita.

Quando ingeridos por um mosquito numa refeição sanguínea, os gametócitos vão-se diferenciar em gâmetas no estômago do mosquito, iniciando o ciclo sexuado do parasita, designado por ciclo esporogónico. Dá-se então a fecundação que origina o zigoto e que se vai diferenciar em oocineto. O oocineto sofre meiose e penetra no tecido epitelial do estômago formando um oocisto que, por mitoses sucessivas, dá origem a milhares de esporozoítos. Estes rompem o oocisto e migram através da hemolinfa até penetrarem as glândulas salivares dos mosquitos. Serão então inoculados num hospedeiro vertebrado durante uma refeição sanguínea. Dependendo das espécies e da temperatura, o ciclo de vida do *Plasmodium* pode durar cerca de 8-10 dias no mosquito e 6-8 dias no hospedeiro vertebrado.

1.2. O vector

Os mosquitos do género *Anopheles* pertencem à Família Culicidae, uma das mais importantes da Ordem Diptera, e são caracterizados por apresentarem um aparelho bucal do tipo picador sugador alongado, constituído por vários estiletes protegidos por uma bainha comum. Esta morfologia permite a adopção de hábitos hematófagos, podendo alimentar-se de sangue de vários vertebrados entre os quais o Homem, conferindo-lhes assim uma grande importância médica. De acordo com a classificação de Richards & Davies (1977) a posição sistemática do género *Anopheles* é a seguinte:

Reino - Animalia

Filo - Arthropoda

Classe - Insecta

Subclasse - Pterigota

Ordem - Díptera

Subordem - Nematocera

Família - Culicidae

Subfamília - Anophelinae

Género - *Anopheles*

A subfamília Anophelinae inclui três gêneros (*Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia*), sendo o gênero *Anopheles* o único com importância médica, por transmitirem as espécies de *Plasmodium* spp. que infectam humanos, além de serem vectores de filarioses e de várias arboviroses (Service, 1980; Ruppert & Barnes, 1996). Existem cerca de 430 espécies conhecidas de mosquitos *Anopheles*, das quais cerca de 70 são vectores de malária (Service & Townson 2002; Warrell & Gilles, 2002).

1.2.1. Ciclo de vida do vector

Durante o seu ciclo de vida, o mosquito passa por 4 fases: ovo, larva, pupa e adulto, e desenvolve-se em dois ambientes distintos: aquático e terrestre (Figura 3).

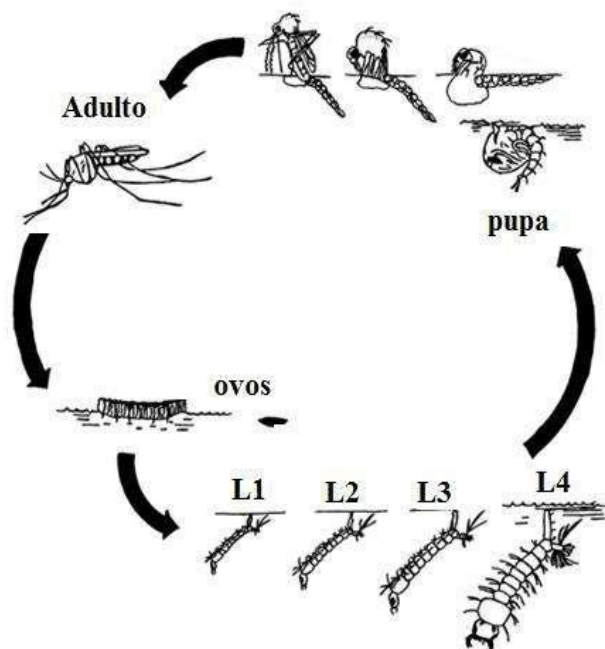


Figura 3. Ciclo de Vida de um mosquito (Diptera: Culicidae) (adaptado de www.wumcd.org/mosquito/lifecycle.html, acessado a 19 de Maio de 2012).

As fêmeas grávidas realizam a oviposição em meios aquáticos. Os locais de oviposição (criadouros larvares) variam de espécie para espécie. Os mais comuns incluem corpos de água naturais tais como margem de rios, lagoas, lagos, poças temporárias e pântanos; ou artificiais como tanques e canais de irrigação. Contudo, diferentes espécies de mosquitos tendem a fazer a postura em criadouros com propriedades físicas e químicas bastantes específicas (Laird, 1988; Mullen & Durden, 2009). Os ovos são colocados um de cada vez (50-300), normalmente à superfície da

água. São em forma de canoa com flutuadores laterais, impedindo deste modo a submersão, e apresentam frequentemente um padrão de ornamentação característico da espécie. Consoante as espécies, o estado de ovo em climas tropicais tem a duração de 2 a 3 dias e, em condições de baixas temperaturas, 7 a 14 dias ou mais (Service, 2008).

Dos ovos eclodem as larvas que passam, através de mudas, por quatro estados de desenvolvimento designados por L1, L2, L3 e L4. As larvas dos mosquitos distinguem-se das de outros insectos aquáticos por serem ápodes e terem um tórax bulboso (mais largo que a cabeça), cabeça bem desenvolvida e um abdómen com 8 segmentos visíveis. Alimentam-se por filtração de partículas em suspensão na água (bactérias, protozoários, detritos orgânicos e outros microorganismos). Em regra, o período larvar tem a duração de 5 a 7 dias em países tropicais, mas algumas espécies necessitam de 7 a 14 dias. Porém, nas zonas temperadas, o mesmo pode durar várias semanas (Service, 1986).

As larvas L4 diferenciam-se em pupas por metamorfose. As pupas não se alimentam mas são activas, passando a maior parte do tempo à superfície da água para respirar e têm forma característica, em vírgula. Nos trópicos esta fase dura 2 a 3 dias, já em regiões temperadas pode durar 9 a 12 dias. Nesta fase ocorrem alterações profundas dos tecidos (metamorfose) que resultam na emergência do adulto, iniciando-se assim a fase terrestre do ciclo de vida.

Após a emergência, os adultos procuram abrigos perto do criadouro para repousar. Na maior parte dos casos, a cópula ocorre 24 a 48 horas após a emergência, geralmente em enxames de machos formados ao anoitecer. Em geral, as fêmeas acasalam apenas uma única vez, acumulando o esperma numa estrutura designada por espermateca. Após a cópula, as fêmeas procuram um hospedeiro vertebrado para realizar uma refeição sanguínea. Esta é necessária à maturação dos ovos que, uma vez concluída, leva a fêmea a procurar um local aquático adequado para realizar a oviposição (Faust *et al.*, 1975). Por vezes, as fêmeas recém-eclodidas e nutricionalmente fracas podem realizar uma primeira refeição sanguínea antes do acasalamento, atingindo o estado de pré-grávida (Charlwood *et al.*, 2003). O período que vai desde a digestão do sangue até à maturação dos ovos designa-se por ciclo gonotrófico e pode durar 2 a 5 dias. Os machos não se alimentam de sangue, apenas de sucos vegetais.

A subfamília Anophelinae distingue-se da subfamília Culicinae pelas seguintes características morfológicas externas: as fêmeas apresentam os palpos tão longos como o probóscis; os palpos dos machos são alargados na extremidade, em forma de clava; o escutelo é arredondado; as asas são geralmente escuras com manchas claras e escuras; o 5º segmento do tarsículo da pata posterior é maior ou igual ao 4º segmento; e não apresentam seda mediana na esterno-pleura. Distinguem-se ainda pela posição do corpo em repouso, pelo tipo e forma das posturas (ovos), pela morfologia das larvas e sua posição relativamente à superfície da água (Figura 4).

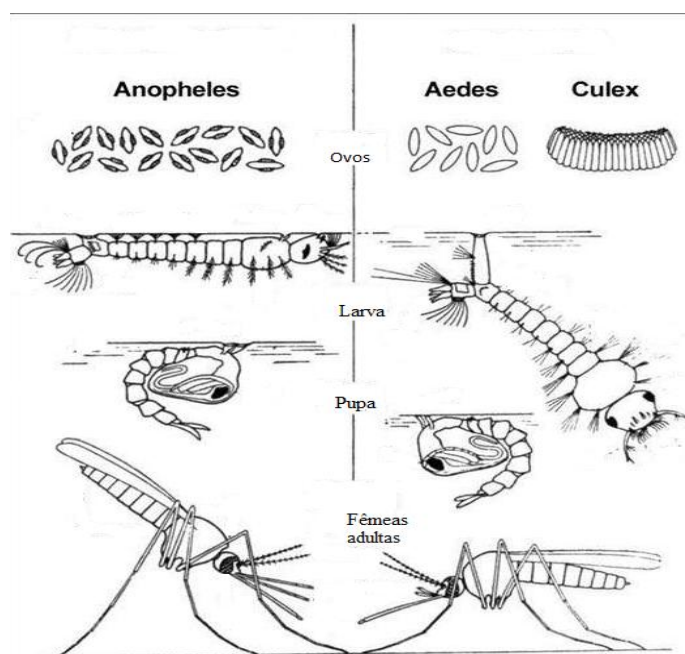


Figura 4. Principais diferenças a nível dos ovos, larvas e posição de repouso dos adultos, entre mosquitos da subfamília Anophelinae (Esquerda) e Culicinae (direita) (adaptado de White, 2003).

Estudos mostram que em condições climáticas favoráveis, a longevidade média de uma fêmea pode ir de 4 a 5 semanas, enquanto a longevidade do macho vai de 2 a 3 semanas. A longevidade depende de características intrínsecas específicas e de factores extrínsecos tais como a temperatura, humidade e presença de inimigos naturais ou predadores. Algumas espécies podem hibernar ou entrar em estivação, escapando deste modo às condições adversas (Service, 1993a; Service, 1993b).

1.2.2. Aspectos bioecológicos e comportamentais do vector

Alguns factores relacionados com a bioecologia e o comportamento dos mosquitos condicionam a sua capacidade vectorial. A capacidade vectorial é uma

medida de transmissão de malária que se traduz no número de infecções secundárias que uma população de anofelíneos de uma determinada espécie, é capaz de produzir a partir de uma única pessoa infectada por dia. Para o cálculo da capacidade vectorial, consideram-se factores como a densidade do vector, a frequência de picada, a longevidade e a duração do ciclo esporogónico do parasita (Black & Moore, 1996; Constantini *et al.*, 1999).

A actividade de picada dos anofelíneos é essencialmente nocturna, com picos de actividade que variam consoante a espécie. Os hábitos de picada dos vectores são determinantes na epidemiologia da transmissão de uma determinada doença, tal como o local de repouso após a refeição sanguínea o é para possíveis medidas de controlo (Service, 1986). Uma espécie de mosquito diz-se antropofílica quando se alimenta preferencialmente de sangue humano e zoofílica quando se alimenta de sangue de outros animais (Snow & Gilles, 2002). No que diz ainda respeito ao hábito de picada, a endofagia designa uma tendência para que as picadas ocorram dentro de habitações humanas e a exofagia quando ocorrem fora das habitações. De igual modo, uma espécie designa-se endofílica ou exofágica quando repousa preferencialmente no interior ou no exterior das habitações humanas, após a refeição sanguínea e durante o ciclo gonotrófico (Calderon *et al.*, 1995).

1.3. O complexo *Anopheles gambiae*

O complexo *Anopheles gambiae* compreende as principais espécies de vectores de malária na região Afrotropical. Fazem parte deste complexo 7 espécies gémeas: *Anopheles gambiae sensu stricto* (s.s.) Giles, 1902; *Anopheles arabiensis* Patton, 1905; *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911; *Anopheles melas* Theobald, 1903; *Anopheles merus* Dönitz, 1902; *Anopheles bwambae* White, 1985 e *Anopheles quadriannulatus* espécie B (Hunt *et al.*, 1998). Apesar de serem morfologicamente idênticas, estas espécies apresentam diferenças bio-ecológicas e comportamentais que influenciam o modo como transmitem a doença (Coluzzi, 1994; Coetzee *et al.*, 2000; della Torre *et al.*, 2002). A distribuição geográfica destas espécies é fundamental para a epidemiologia da malária e definição de estratégias de controlo da doença numa determinada região (Tsy *et al.*, 2003; Coetzee, 2004).

Neste complexo, as espécies *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis*, são as mais associadas ao Homem e com maior distribuição geográfica na região Afrotropical, ocorrendo em simpatria em extensas áreas da sua distribuição. Apesar de apresentarem diferenças a nível comportamental e de eficiência vectorial, são as espécies mais importantes do ponto de vista epidemiológico. As espécies *An. merus* e *An. melas* estão adaptadas a ambientes de água salobra. O *An. melas* é um importante vector da malária em muitas localidades ao longo da costa Oeste Africana, principalmente na época seca, quando a população de *An. gambiae* s.s. é menos abundante. O *An. merus* ocupa zonas costeiras da África Oriental e é considerado um vector secundário de malária (Gillies & deMeillon, 1968; Cuamba & Mendis, 2009). *Anopheles bwambiae* é um vector localizado, ocorrendo na região da floresta Semliki do Uganda e adaptada a criadouros de águas termais (White, 1985). Finalmente, as espécies *An. quadriannulatus* A e B são zoofílicas e não são consideradas vectores de malária.

Apesar de morfologicamente indistintas, os membros do complexo *An. gambiae* podem ser identificados com base em métodos citogenéticos (inversões paracêntricas no cromossoma X) e moleculares (polimorfismos específicos de espécies no DNA ribossómico) (Scott *et al.*, 1993; Coluzzi *et al.*, 2002).

A espécie nominal do complexo, *An. gambiae* s.s., encontra-se ainda subdividida em duas formas moleculares, denominadas M e S (della Torre *et al.* 2001). Estas formas são consideradas unidades de um processo de especiação incipiente e foram inicialmente identificadas com base em polimorfismos nos espaçadores intergénicos do DNA ribossomal (della Torre *et al.*, 2002). A forma S é a única encontrada na África Ocidental e Oriental ao passo que a forma M ocorre apenas na África Ocidental, muitas vezes em simpatria com a forma S. No entanto, apesar de ambas as formas partilharem extensas áreas de simpatria na África Ocidental, a ocorrência de híbridos M/S é um evento raro (della Torre *et al.*, 2005). Uma excepção é o extremo oeste da distribuição (Gambia e Guiné-Bissau), onde foram registadas elevadas frequências de híbridos (Caputo *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008). O grau de diferenciação genética entre formas parece variar geograficamente, estando concentrado em regiões centroméricas de baixa recombinação, nos cromossomas X, 2 e 3, onde poderão ocorrer genes associados ao isolamento reprodutivo (Turner *et al.*, 2005; White *et al.*, 2010; Weetman *et al.*, 2012).

Do ponto de vista fenotípico, as formas moleculares parecem apresentar diferenças bio-ecológicas (Lehmann & Diabaté, 2008). A forma M encontra-se melhor adaptada a criadouros larvares mais permanentes (*e.g.* arrozais) devido a uma capacidade de sobrevivência em condições de pressão por predadores. A forma S está melhor adaptada a criadouros temporários, mais efémeros e com pouca pressão de predadores. Estas diferenças explicam a ocupação de habitats mais áridos pela forma M, onde criadouros permanentes são mais abundantes (Kristan *et al.*, 2003; della Torre *et al.*, 2005).

1.4. Controlo da malária

De um modo geral, os programas nacionais de controlo de malária assentam em três pilares de actuação: O controlo do parasita, efectuado com base no tratamento de casos e na quimioprofilaxia de grupos-alvo (crianças até aos 5 anos de idade e mulheres grávidas) com fármacos antimaláricos; uma componente de educação comunitária, essencial para promover alterações nos hábitos das populações humanas que influenciam a eficácia dos métodos de controlo (*e.g.* uso correcto de mosquiteiros, a necessidade de completar os regimes terapêuticos); o controlo do vector.

O principal objectivo de um programa de controlo de vectores é a diminuição do contacto homem-vector, com a consequente redução da transmissão do agente patogénico até ao limiar crítico abaixo do qual a doença provocada por esse agente patogénico deixa de ser um problema de saúde pública. O controlo efectivo de vectores não pode depender de um único método e é essencial dispor de alternativas adequadas à realidade local, que permitam sua execução de forma integrada e seletiva (Collins *et al.*, 2000). As medidas de controlo podem ser aplicadas tanto a formas imaturas (larvas e pupas) como a mosquitos adultos (Service, 2008). Várias estratégias foram concebidas e postas em prática com a finalidade de reduzir a população de mosquitos ou de prevenir o contacto humano-vector. Outras estratégias estão a ser investigadas como possíveis soluções para serem aplicadas nos programas de controlo (Ramirez *et al.*, 2009). As diversas estratégias de controlo podem enquadrar-se em quatro tipos principais: biológico, químico, físico e genético.

O controlo biológico consiste na redução da população de vectores por introdução de inimigos naturais da espécie vectora (*e.g.* predadores, competidores, ou

agentes patogénicos) e de produtos biológicos sintetizados pela própria espécie-alvo mas aplicados de forma a induzir alterações no seu desenvolvimento ou comportamento (Morena *et al.*, 2002). Apesar dos resultados não serem imediatos, têm a vantagem de serem alternativas não-poluentes aos métodos químicos (Hemingway, 2005).

Os métodos de controlo genético são mais direccionados às formas adultas (Service, 1986; Service, 2008). O principal objectivo é induzir alterações genéticas desvantajosas para a espécie-alvo ou para o agente patogénico durante o seu desenvolvimento no vector. Estas incluem a técnica de libertação de insectos estéreis (SIT– *sterile insect technique*), na qual machos esterilizados por processos químicos ou genéticos são libertados para acasalarem com fêmeas da população natural, causando a oviposição de ovos inférteis (Service, 1986; Pates & Curtis, 2005; Service, 2008).

O controlo físico consiste em eliminar ou modificar potenciais criadouros larvares. Assim, tornam-se as condições do ambiente desfavorável ao desenvolvimento das fases do ciclo de vida dependentes da água (ovo, larva e pupa) através de estratégias tais como a drenagem de águas paradas, retificação das bacias dos cursos de água, ou a eliminação de recipientes e pneus abandonados (Service, 1986).

1.4.1. Controlo químico

Este tipo de controlo permanece a principal componente de programas de controlo da malária e consiste no uso de insecticidas de síntese química. Todos os insecticidas foram inicialmente desenvolvidos para fins agrícolas para o combate de pragas, tendo sido, posteriormente, adaptado o seu uso em saúde pública nos diversos programas de controlo de vectores, (Hemingway *et al.*, 2004). Neste contexto, o desenvolvimento de inseticidas de longo efeito residual foi um dos avanços mais importantes para a sua aplicação em saúde pública. O primeiro inseticida com efeito residual prolongado foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, que, quando aplicado no interior das habitações, permanecia activo contra os insectos por vários meses (Rozendaal, 1997).

Segundo a OMS, quatro classes de insecticidas químicos asseguram os programas de controlo de vectores: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, actuando todos ao nível do sistema nervoso central dos insectos.

Os organoclorados são classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos. O grupo dos difenil-alifáticos é o mais antigo e inclui o DDT. Estes compostos actuam nos canais de sódio do sistema nervoso destruindo o equilíbrio iónico dos axónios, impedindo deste modo a transmissão normal do impulso nervoso em insectos e mamíferos, causando a paralisia e morte do insecto (Hemingway *et al.*, 2004). Embora os organoclorados tenham sido amplamente usados em programas de controlo de malária nos anos 1950-1970, tiveram seu uso descontinuado devido à sua persistência no ambiente. No entanto, estas restrições foram recentemente levantadas pela OMS para o uso estrito no controlo de vectores em regiões de elevada endemicidade de malária (WHO, 2001; WHO, 2006).

Os organofosforados, são amplamente utilizados em saúde pública por apresentarem vantagens sobre os organoclorados, tais como serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos. Apresentam, porém, como principal desvantagem, a instabilidade química, o que torna obrigatória a renovação periódica da sua aplicação. Além disso, são mais tóxicos para os vertebrados que os organoclorados, mesmo em doses relativamente baixas. Os organofosforados actuam inibindo a Acetilcolinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso.

Os carbamatos são insecticidas derivados do ácido carbâmico e a sua comercialização teve início por volta dos anos 1960. Assim como os organofosforados, os carbamatos têm ação letal rápida sobre os insetos, efeito residual curto e também inibem a Acetilcolinesterase. Em contraste com os organofosforados, esta inibição é reversível, facto que permite uma recuperação rápida em casos de envenenamento accidental em mamíferos (Braga & Valle, 2007).

Os piretróides sintéticos derivam de uma substância natural, o *pirethrum*, extraído de crisântemos (*Chrysanthemum* spp.). São biodegradáveis, não cumulativos e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos. Esta classe de insecticidas pode ser subdividida em dois grupos: piretróides tipo I (*e.g.* permetrina), sem um grupo alfa-ciano; e piretróides tipo II (*e.g.* deltametrina) que apresentam um grupo alfa-ciano. Ambos apresentam um modo de acção similar ao DDT, actuando ao nível dos canais de sódio (Hemingway *et al.*, 2004). Os insecticidas piretróides são actualmente os únicos químicos recomendados pela WHOPES (*World Health Organization Pesticide Scheme*) para impregnação de redes, devido à sua baixa

toxicidade para mamíferos e rápida actuação contra os mosquitos (Pennetier *et al.*, 2007; Pennetier *et al.*, 2009). Estudos sobre a acção de redes impregnadas com piretróides, demonstraram grandes benefícios destas na redução da morbilidade e mortalidade da malária. Estudos piloto mostraram uma redução global da mortalidade em menores de cinco anos de 17% em comunidades protegidas com mosquiteiros impregnados, em comparação com comunidades protegidas apenas com mosquiteiros não impregnados (OMS/UNICEF, 2003).

1.5. Resistência a insecticidas

A resistência aos insecticidas é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insectos tolerar uma dose de insecticida que, em condições normais, causaria sua morte (Swaroop, 1968).

Os insecticidas têm sido bastante usados na agricultura, agropecuária e na Saúde Pública. Como consequência, o uso intensivo destes químicos tem provocado o aparecimento de populações de insectos resistentes, causando deste modo graves obstáculos ao controlo de vectores. O número de espécies de insectos resistentes com importância em saúde pública aumentou consideravelmente de duas em 1946 para 198 em 1990 (Soderlund & Knipple, 2003). A resistência aos insecticidas pode ser pensada como um processo de evolução acelerada de uma população que responde a uma intensa pressão selectiva, com a consequente sobrevivência dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência. É por isso também considerada uma característica hereditária, envolvendo alterações em um ou mais genes (Hemingway *et al.*, 2004).

Segundo Hemingway e colaboradores (2004), os mecanismos de resistência a insecticidas podem ser divididos em dois grupos: resistência metabólica, que consiste em alterações da actividade de proteínas enzimáticas de destoxificação (esterases, glutathione-S-transferases, citocromo P450 monooxigenases); e mecanismos local-alvo (*target-site*), que consistem em mutações que alteram a conformação do local onde actua o insecticida, impedindo a ligação do insecticida ao seu alvo.

Muitos insecticidas podem ainda induzir alterações de comportamento nas populações de insectos. Este fenómeno, conhecido como resistência comportamental, está relacionado com a capacidade dos vectores evitarem o contacto com o insecticida. Um exemplo de mudança comportamental é a alteração dos hábitos de repouso:

mosquitos que originalmente são endofílicos, mas que devido ao contacto continuado com o insecticida tornaram-se exofílicos (Georghiou, 1972).

1.5.1. Resistência *Knockdown*

Os canais de sódio são o local-alvo dos piretróides e de alguns organoclorados como o DDT. A ligação destes inseticidas mantém os canais de sódio na conformação aberta e, conseqüentemente, há uma propagação contínua do impulso nervoso, que resulta na morte do insecto por paralisia. Conhecido como mecanismo *knockdown resistance* (*kdr*), este tipo de resistência resulta de mutações pontuais no gene que codifica o canal de sódio, que alteram a sua afinidade ao insecticida (Soderlund, 1997; Soderlund & Knipple, 1999). Este tipo de resistência foi observado em várias espécies de insectos, tendo sido inicialmente descrito em *Musca domestica* (Soderlund & Knipple, 1999).

No vector da malária *An. gambiae* s.s., foram descritas duas mutações pontuais associadas à resistência *kdr*; a primeira envolve uma mudança nucleotídica que resulta na substituição de um resíduo de leucina (TTA), presente no alelo selvagem, para uma fenilalanina (TTT) na posição aminoacídica 1014 do gene que codifica a subunidade transmembranar S6 do domínio II do canal de sódio (Figura 5). Esta mutação está bastante dispersa na África Ocidental (Chandre *et al.*, 1999b; Fanello *et al.*, 2003; Yawson *et al.*, 2004). A segunda é uma substituição do resíduo leucina (TTA) por uma serina (TCA) na mesma posição aminoacídica e foi inicialmente encontrada na África Oriental (Ranson *et al.*, 2000b).

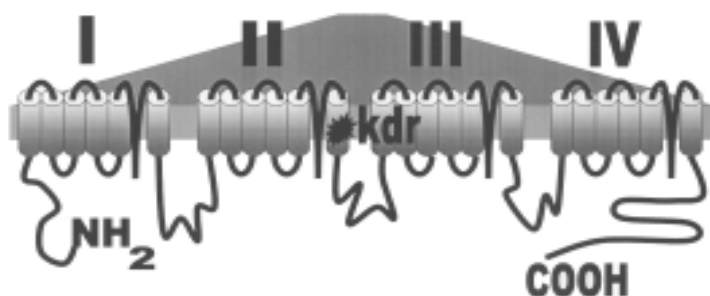


Figura 5. Representação esquemática dos quatro domínios do canal de sódio. A resistência *kdr*, em várias espécies de insectos, deve-se a uma mutação aminoacídica pontual na posição 1014 do sexto segmento transmembranar do domínio II do canal de sódio (IIS6) (adaptado de Brogdon & McAllister, 1998).

As mutações *kdr* não são homogeneamente distribuídas entre as duas formas moleculares (M e S) de *An. gambiae* s.s. Ambas foram encontradas inicialmente na forma S, com a mutação L1014F a atingir elevadas frequências em populações da África ocidental e a mutação L1014S aparentemente restrita a populações da África Central (em co-ocorrência com L1014F) e África oriental (Weill *et al.*, 2000; Etang *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006 Santolamazza *et al.*, 2008). Em contraste, a frequência de mutações *kdr* na forma M parece ser bastante inferior, mesmo quando se estudaram populações desta forma em simpatria com populações da forma S que apresentam elevada frequência *kdr*, na África Ocidental (Santolamazza *et al.*, 2008). Esta observação foi considerada uma das principais evidências de restrição ao fluxo genético entre as formas moleculares de *An. gambiae* s.s. (Weill *et al.*, 2000; Santolamazza *et al.*, 2008; Etang *et al.*, 2009). Na África Ocidental, um estudo revelou que a mutação L1014F terá sido introduzida na forma M por introgressão a partir da forma S (Weill *et al.*, 2000), embora origens independentes desta mutação na forma M tenham sido também observadas nos Camarões (Etang *et al.*, 2009). Estudos mais recentes parecem sugerir que as frequências *kdr* também estão a aumentar na forma M na África Ocidental. Também já foi detectada a mutação L1014S em *An. arabiensis* no Quênia (Stump *et al.*, 2004; Kulkarni *et al.*, 2006; Mathias *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem uma rápida dispersão das mutações *kdr*, possivelmente associada a pressões selectivas por acção dos insecticidas, quer de programas de controlo quer do uso na agricultura (Diabaté *et al.*, 2002; Awolola *et al.*, 2005). Há evidências de que o uso do DDT contra pragas na agricultura na década de 1960 e 1970 também poderá ter contribuído para a seleção da mutação *kdr* nestes vectores (Chandre *et al.*, 1999b; Etang *et al.*, 2003).

A resistência *kdr* em *An. gambiae* s.l. tem-se tornado comum em diferentes regiões de África e pode representar uma ameaça para a implementação bem sucedida e sustentável de programas de controlo.

1.5.2. Resistência ACE-I

Este tipo de resistência está relacionado com uma redução da afinidade da enzima acetilcolinesterase (AChE) aos insecticidas carbamatos e organofosforados (Brogdon e McAllister, 1998; Hemingway & Ranson 2000b). A enzima AChE é

responsável pela degradação da acetilcolina, molécula neurotransmissora que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso. Os carbamatos e organofosfatos actuam inibindo a AChE e, em consequência, a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso não cessa, levando deste modo o insecto à morte (Braga & Valle, 2007).

Foram identificados dois genes, *ace-1* e *ace-2*, que codificam a enzima AChE em insectos, incluindo *An. gambiae* s.s. (Malcolm *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2001). A mutação G119S, resultante da substituição de uma glicina (GGC) por uma serina (AGC) na posição 119 do gene *ace-1* tem sido descrita em vários organismos como associada à resistência a insecticidas organofosfatos e carbamatos em vários organismos, incluindo *An. gambiae* (Mutero *et al.*, 1994; Weill *et al.*, 2004; Djogbénou *et al.*, 2007). O gene *ace-2* parece não estar implicado na resistência aos insecticidas. Estudos demonstraram que o gene *ace-1* tem sido responsável pela redução da afinidade da enzima AChE em duas espécies de mosquitos vectores, *An. gambiae* e *Culex pipiens* L., 1758. Elevados níveis de insensibilidade da enzima AChE têm sido descritos em *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820, *An. gambiae* e *Culex pipiens* (Ayad & Georgiou, 1975; Bourguet *et al.*, 1996; N'Guessan *et al.*, 2003; Weill *et al.*, 2002).

1.5.3. Determinação de resistências no terreno

Dos vários métodos para determinar resistência a insecticidas no terreno, os ensaios padronizados da OMS (testes de tubos) e os ensaios de garrafa do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) são os mais utilizados para testar mosquitos adultos (Brogdon & McAllister, 1998; WHO, 1998). De um modo geral, estes ensaios consistem em expor amostras de mosquitos a doses (concentração ou tempo de exposição) diagnósticas do insecticida, de modo a determinar taxas de mortalidade e avaliando o estado de susceptibilidade da população com base em valores de mortalidade de referência. Quando realizados com regularidade, estes testes permitem a detecção precoce das resistências. Contudo, não fornecem informação sobre o mecanismo de resistência envolvido, tal como acontece com os ensaios bioquímicos e com técnicas de biologia molecular.

Comum a ambos os testes é a utilização de amostras de mosquitos com a mesma idade ou idade aproximada (3-5 dias). Isto porque a idade de um mosquito é um factor

que influencia a sua susceptibilidade aos insecticidas (Lines & Nassor, 1991; Jones *et al.*, 2012). Assim, é prática corrente realizar-se testes de susceptibilidade com amostras de mosquitos provenientes de colheitas de larvas, que são criadas em insectário até à fase de adulto, podendo-se assim controlar a idade dos mosquitos testados.

Uma desvantagem nas colheitas larvares é que estas podem aumentar a probabilidade de se amostrarem indivíduos provenientes da postura de um número limitado de fêmeas (Goldberg & Waits, 2010). Um maior parentesco entre os indivíduos amostrados pode enviesar os resultados obtidos, quer para a determinação do nível de susceptibilidade, quer nas frequências genótípicas de genes associados às resistências. Uma forma de inferir o efeito da amostragem consiste na determinação do grau de parentesco entre os indivíduos amostrados. Embora a determinação precisa do grau de parentesco entre indivíduos implique informação de *pedigree*, existem alguns estimadores indirectos que se baseiam nas frequências alélicas de marcadores genéticos com elevado grau de polimorfismo, tais como microssatélites (Van de Castele *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2012).

Os microssatélites, *simple sequences repeats* (SSR) ou *short tandem repeats* (STR) são sequências de DNA repetitivo compostos por pequenos motivos, geralmente de 1 a 6 pares de bases (pb). São considerados *loci* altamente polimórficos, codominantes e estão presentes no genoma da maioria dos organismos analisados até ao momento, ocorrendo frequentemente em regiões não codificantes do genoma. São considerados óptimos marcadores moleculares para estudos de estrutura genética populacional, identificação de parentesco, análises forenses e diagnóstico (Jarne & Lagoda, 1996; Goodman, 1998; Oosterhout *et al.*, 2004).

1.6. Malária em Angola

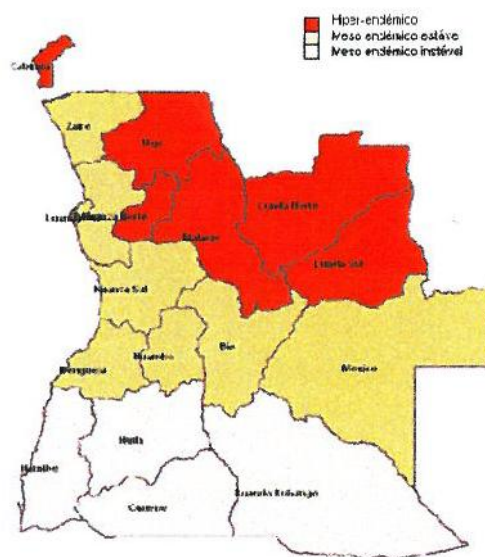
A República de Angola encontra-se situada na costa ocidental da África Austral, entre os paralelos 4° e 18° de latitude sul. A norte, faz fronteira com a República Democrática do Congo e a República do Congo, a sul com a República da Namíbia, a leste com a República da Zâmbia e a oeste é banhada pelo Oceano atlântico. A sua extensão geográfica é de 1.246.700 km² e a população foi estimada em cerca de 18 milhões (CIA-The World Factbook, 2012).

O clima varia consoante a latitude, a altitude e a continentalidade, desde semi-árido (sul) a tropical húmido (norte). A estação chuvosa vai de Setembro a Maio, sendo os restantes meses secos ou de baixa pluviosidade; a humidade relativa é geralmente alta no litoral (80% em média), apresentando variação no interior planáltico do país (75-80%) na época das chuvas e 35 % no cacimbo (época fria ou seca). A temperatura média anual diminui de norte a sul, variando de 24 a 20°C (INAMET, 2011). A maior parte do território é coberta de vegetação do tipo savana com ou sem matas. A restante é constituída por floresta densa e húmida (norte), ou estepe e deserto (sul).

Em Angola, a malária constitui a maior causa de mortalidade e morbilidade, especialmente em crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas. Em 2004, foram notificados 3,2 milhões de casos, dois terços dos quais ocorridos em crianças menores de 5 anos de idade e aproximadamente 38 mil mortes. Mais de 90% da população Angolana está em risco de contrair a malária. Esta doença contribui com 35% da mortalidade infantil, 25% da mortalidade materna, 60% dos internamentos hospitalares de crianças menores de 5 anos e 10% dos internamentos das mulheres grávidas. Um estudo sobre o impacto económico da malária em Angola realizado em 1995, estimou um custo global anual de 125 milhões de dólares. O custo médio unitário do episódio palúdico totalizou 34 dólares norte-americanos, dos quais 63,8% são suportados directamente pela família, com particular incidência nas famílias pobres das áreas rurais, onde o custo directo corresponde a 100% do valor mensal individual de manutenção alimentar e familiar (Ministério da Saúde de Angola, 2007).

A malária é endémica em todo território angolano, apresentando três níveis de endemicidade: hiperendémica, mesoendémica estável e mesoendémica instável (Figura 6). Observa-se um aumento considerável da transmissão da malária durante a estação chuvosa, com picos entre os meses de Janeiro a Maio (Ministério da Saúde de Angola, 2007).

Estão identificados quatro parasitas causadores da malária no país, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale*, sendo o *P. falciparum* o responsável pelo maior número de casos de infecção (87%) e de mortalidade (Fortes, 2011).



Em Angola, o género *Anopheles* tem merecido uma especial atenção devido ao seu envolvimento na transmissão da malária. Actualmente, estão descritas 53 espécies de *Anopheles* no território, entre as quais se incluem os mais importantes vectores da malária em África. Assim, os principais vectores de malária no país são as espécies pertencentes ao complexo *An. gambiae* e ao complexo *Anopheles funestus* Giles, 1900. De salientar ainda a presença de outras espécies consideradas vectores secundários de malária tais como *Anopheles coustani* Laveran, 1900, *Anopheles paludis* Theobald, 1900, *Anopheles nili* Theobald, 1904, *Anopheles Ziemani* Grunberg, 1902, e *Anopheles pharoensis* Theobald, 1910. O complexo *An. gambiae* encontra-se representado pelas espécies *An. gambiae* s.s., *An. melas* e *An. arabiensis* (Ribeiro & Ramos, 1995).

Os resultados de alguns estudos realizados em Angola identificaram a presença das duas formas moleculares, M e S, de *An. gambiae* s.s. A forma M tem sido encontrada principalmente em localidades costeiras das províncias de Luanda, Benguela e Namibe, zonas de clima tropical seco, enquanto a forma S é encontrada com maior frequência em zonas costeiras do norte (Cabinda e Zaire) e localidades do interior, locais relativamente mais húmidos. Existem relatos da co-ocorrência das duas formas em áreas do interior (Cuamba *et al.*, 2006; Calzetta *et al.*, 2008).

Existem poucos estudos sobre a resistência dos vectores aos insecticidas no País. Os resultados obtidos por Cardoso (2007) mostraram níveis baixos de resistência aos

insecticidas testados, com taxas de mortalidade que variaram entre os 94% e os 100%. A única exceção foi para o *Anopheles listeri* de Meillon 1931 na província de Benguela, que apresentou uma taxa de mortalidade inferior a 80% nos ensaios com DDT, o que sugere resistência a este insecticida. Relativamente às mutações *kdr*, há registos dos dois alelos associados à resistência a insecticidas piretróides e DDT (1014F e 1014S) nas províncias de Cabinda e Luanda. No enclave de Cabinda, as duas mutações *kdr* foram encontradas com elevada frequência, já em Luanda foi encontrado apenas o alelo 1014F e em frequências muito reduzidas (Carrara *et al.*, 2002; Cardoso, 2007; Santolamazza *et al.*, 2008).

1.7. Objectivos do estudo

O presente trabalho teve como objectivos:

- 1) Avaliar os níveis de resistência a insecticidas piretróides, organoclorados, carbamatos e organofosfatos em populações naturais de *An. gambiae* s.l. na província de Luanda, Angola.
- 2) Determinar mutações nos genes *kdr* e *ace-1* em *An. gambiae* s.l. e correlacionar a sua frequência com os níveis de resistência observados.
- 3) Determinar, por microssatélites, o grau de parentesco entre os indivíduos analisados, de modo a avaliar se houve influência do método de amostragem de mosquitos (colheita de imaturos) nos níveis de resistência e frequências de genes associados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização da área de estudo

Luanda é a capital de Angola. Localizada na costa do Oceano Atlântico, é também o principal centro económico do país. É a cidade mais populosa, com uma população de aproximadamente 4,5 milhões de habitantes, em 2010 (CIA-The World Factbook, 2012). O clima é quente e húmido, com uma precipitação média anual de 23mm, temperatura de 25,9°C e humidade relativa de 76%. (INAMET, 2011). As características ecológicas, climáticas, vectoriais e humanas permitem que a transmissão da malária na província se processe de uma forma mesoendémica estável (Ministério da Saúde de Angola, 2007).

2.2. Material biológico

O material biológico utilizado neste trabalho foi obtido através de prospeções de criadouros larvares efectuadas nos municípios de Kilamba Kiaxi (8°56'S; 13°15'E) e Viana (8°54'S; 13° 22'E), na província de Luanda. As colheitas foram efectuadas em Abril/Maio de 2009 e em Fevereiro/Março de 2010 (Ver Figura A, em anexo). Para as colheitas de larvas foram usados caços, pipetas e garrafas plásticas para o seu transporte para uma sala do PNCM, com temperatura e humidade controladas (24°C-28°C e 60%-80%). Aqui fez-se a separação das larvas e pupas de anofelíneos para tinas de criação. Durante o desenvolvimento larvar, as tinas foram regularmente preenchidas com água dos criadouros e alimentadas com uma mistura de farinha de peixe e bolacha-maria.

Diariamente, colectavam-se as pupas, com auxílio de uma pipeta, que eram colocadas em copos descartáveis com água mineral e de seguida eram colocados em gaiolas (20X20cm) com rede de tule. Os adultos emergidos nas gaiolas eram alimentados com água açucarada (6-8%) embebida em algodão. O algodão humedecido com a água açucarada garantia ainda a manutenção da humidade nas gaiolas. Os adultos eram assim mantidos durante 3-5 dias, até à realização dos ensaios de susceptibilidade.

2.3. Testes de susceptibilidade dos vectores da malária

A susceptibilidade aos insecticidas foi determinada através de testes de susceptibilidade da OMS em mosquitos adultos (WHO, 1963; WHO, 1998). Foi testada

a susceptibilidade a 5 insecticidas às concentrações recomendadas pela OMS (WHO, 1998): DDT 4%, λ -cialotrina 0.05%, fenitrotião 0.05%, bendiocarb 0.05% e permetrina 0.75%. A Figura B (em anexo) ilustra o procedimento dos testes de susceptibilidade.

Em cada um dos tubos de repouso, foi ajustado um pedaço de papel branco fixo com um clipe de aço e acoplaram-se as lâminas de passagem. Os mosquitos foram colhidos das gaiolas com um aspirador bucal do tipo OMS e cuidadosamente transferidos para os tubos de repouso, através do orifício da lâmina de passagem. Neste procedimento, seleccionaram-se mosquitos anofelíneos fêmea pela visualização das suas características morfológicas através do aspirador bucal. Foram colocados entre 20 e 25 fêmeas em cada tubo de repouso. Nos tubos controlo, e quando o número de fêmeas foi insuficiente, utilizaram-se 20-25 machos. Os tubos de repouso foram colocados na vertical durante uma hora, após a qual foi registada a mortalidade pré-teste.

No interior de cada um dos tubos de exposição foi introduzida uma folha de papel impregnado com insecticida a testar, ajustado às paredes e fixo por cliques de cobre. Nos tubos de controlo, foi introduzida uma folha de papel com excipiente do insecticida. Os tubos de exposição foram então acoplados à lâmina de passagem e procedeu-se à transferência dos mosquitos dos tubos de repouso para os tubos de exposição, tendo-se anotado a mortalidade em cada tubo após a transferência. A exposição decorreu com os tubos na posição vertical durante uma hora, sob condições de temperatura e humidade relativa controladas (24°C-28°C e 55%-85%, respectivamente). Procedeu-se ao registo dos mosquitos caídos nos seguintes tempos de exposição: 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

No fim do tempo de exposição, os mosquitos foram novamente transferidos para os tubos de repouso. Os tubos de repouso foram colocados em posição vertical e mantidos por 24 horas. Sobre a grelha, situada na parte superior do tubo, colocaram-se pedaços de algodão embebido numa solução açucarada para garantir o alimento dos mosquitos sobreviventes.

Ao final de 24 horas pós-exposição, foram registadas as mortalidades em cada tubo (controlos e teste). Os tubos de repouso foram abertos dentro de uma gaiola. Os mosquitos vivos foram aspirados com auxílio de um aspirador eléctrico, mortos por congelamento, contados e conservados individualmente em microtubos (0,5ml) com

sílica gel e algodão. Os mosquitos mortos foram contados e também transferidos individualmente para microtubos com sílica gel e algodão. Os microtubos, devidamente etiquetados, foram transportados e conservados à temperatura ambiente até à extracção de DNA.

Para cada insecticida, tentou-se ensaiar um mínimo de 100 mosquitos fêmea em 4-5 tubos de exposição, juntamente com 20-25 mosquitos controlo (machos ou fêmeas). A taxa de mortalidade para cada insecticida foi calculada a partir do somatório dos mosquitos expostos em cada tubo, de acordo com a recomendação da OMS (WHO, 1998). Quando a mortalidade nos tubos controlo atinge valores entre 5 e 20%, a mortalidade registada nos tubos expostos ao insecticida é corrigida pela fórmula de Abbot (WHO, 1963):

$$\frac{\% \text{ mortalidade tubos teste} - \% \text{ mortalidade tubo controlo}}{100 - \% \text{ mortalidade tubo controlo}} \times 100$$

De acordo com a OMS (WHO, 1998), as taxas de mortalidade observadas nas exposições aos insecticidas dão uma indicação do estado de susceptibilidade da população em estudo, com base nos seguintes intervalos: taxa de mortalidade superior a 97% é indicativo de susceptibilidade, taxas de mortalidade entre 80 e 97% sugerem possibilidade de resistência e taxas de mortalidade abaixo de 80% correspondem a resistência.

2.4. Extracção de DNA

A extracção de DNA genómico de mosquitos individuais foi realizada por um protocolo de fenol-clorofórmio adaptado de Donnelly *et al.*, (1999). Em cada conjunto de 30 amostras extraídas, foi incluído um branco de extracção (*i.e.* tubo sem material biológico). Para a homogeneização, os mosquitos foram esmagados individualmente em microtubos de 1,5ml, com o auxílio de homogeneizadores de plástico, em 305µl de tampão de lise (Ver em anexo), seguindo-se uma incubação de 1h a 65°C. De seguida, adicionou-se 305µl de fenol-clorofórmio-isoamil (25:24:1), pH 8.0 a cada amostra, misturou-se cuidadosamente no agitador horizontal durante 15 minutos, levou-se a centrifugar a 13000xg durante 12 minutos e transferiu-se a fase aquosa (fase superior) para um novo tubo. O mesmo procedimento repetiu-se, mas com a adição de 300 µl de clorofórmio-isoamil (24:1) em vez do fenol-clorofórmio.

Para a precipitação do DNA, foram adicionados 600µl de etanol absoluto e 60µl de acetato de amónio 10M e misturou-se no agitador horizontal durante 15 minutos. A mistura foi incubada a -20°C durante 30 minutos, sendo de seguida centrifugada a 13000xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* de DNA foram lavados com a adição de 600µl de etanol 70%, seguida de agitação em vortex e centrifugação a 13000xg durante 10 minutos, findos os quais procedeu-se à remoção do sobrenadante e à secagem em estufa a 37°C durante a noite.

O DNA foi eluído em 100µl de tampão TE (Tris-HCl, pH 8.0 10mM, EDTA, pH 8.0 1mM) e 100µl de água bi-distilada (ddH₂O), sendo conservado a -20°C. Foram preparadas alíquotas de trabalho de 30µl, em microtubos de 0,5ml, que foram conservadas a 4°C durante as análises moleculares.

2.4.1. Identificação molecular de espécies e formas moleculares de *An. gambiae* s.l.

A identificação das espécies do complexo *An. gambiae* e formas moleculares M e S de *An. gambiae* s.s., foi realizada por PCR-RFLP, de acordo com os protocolos descritos por Scott *et al.* (1993) e Fanello *et al.* (2002). Esta técnica baseia-se em polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) localizados nos espaçadores intergénicos (IGS) do DNA ribossomal (rDNA), que são específicos das espécies do complexo. O fragmento amplificado contém ainda um polimorfismo, detectado pela enzima de restrição *HhaI*, que diferencia as formas moleculares M e S (Favia *et al.*, 1997; Fanello *et al.*, 2002) como se pode observar na Figura 7.

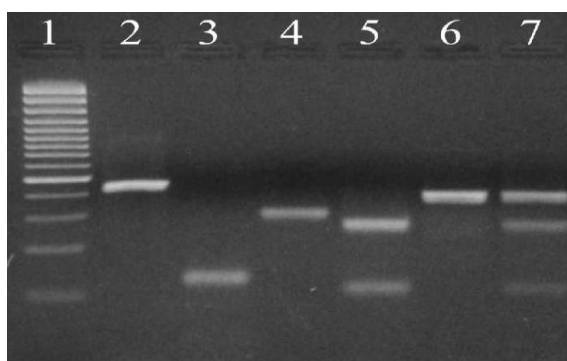


Figura 7. Fotografia de um gel de agarose (2%) contendo os produtos da reacção de PCR-RFLP para identificação das espécies e formas moleculares do complexo *An. gambiae*. 1 – marcador de peso molecular de 1kb; 2 – *An. melas*; 3 – *An. quadriannulatus*; 4 – *An. arabiensis*; 5 – *An. gambiae* s.s. forma S; 6 – *An. gambiae* s.s. forma M; 7 – *An. gambiae* s.s. híbrido M/S (adaptado de Fanello *et al.*, 2002)

Nas reacções de PCR, foi utilizado um *primer* forward universal (UN), comum a todas as espécies e primers reverse, específicos para as espécies *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* e *An. melas* (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados na amplificação da região IGS do rDNA.

Primer	Sequência (5'-3')
<i>Primer</i> universal (<i>forward</i>) – UN	5' – GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT – 3'
<i>Primer</i> <i>An. gambiae</i> (<i>reverse</i>) – GA	5' – CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT – 3'
<i>Primer</i> <i>An. arabiensis</i> (<i>reverse</i>) – AR	5' – AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA – 3'
<i>Primer</i> <i>An. melas</i> (<i>reverse</i>) – ML	5' – TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA – 3'

Cada grupo de reacções de amplificação incluiu controlos positivos para as formas moleculares M e S de *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis*, *An. melas* e um controlo negativo (*i.e.* sem DNA molde). A composição das misturas está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição da mistura de reacção para amplificação da região IGS do rDNA de *An. gambiae s.l.*

Reagentes	Concentração Final
Tampão 5X Green GoTaq® (Promega, USA)	1X
MgCl ₂ (25mM) (Promega, USA)	2,5mM
dNTPs (2mM) (Promega, USA)	0,2mM
<i>Primer</i> UN	0,5ng/μl
<i>Primer</i> GA	0,25ng/μl
<i>Primer</i> AR	0,75ng/μl
<i>Primer</i> ML	0,5ng/μl
<i>Go Taq</i> ® DNA Polimerase (Promega ,USA)	0,05U
DNA <i>template</i>	1μl (diluição 1:10)
ddH ₂ O	Até perfazer 10μl
Volume Total	10μl

As condições de amplificação decorreram num termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, California, USA) e estão descritas na Tabela 3. Para conservação no termociclador, o programa de ciclos foi concluído a uma temperatura de 4°C.

Tabela 3. Condições de amplificação da região do rDNA de *An. gambiae s.l.*

Temperatura		Tempo
Desnaturação	94°C	30seg
Annealing	30 ciclos 50°C	30seg
Extensão	72°C	30seg
Extensão Final	72°C	10min

2.4.2. Restrição enzimática do produto amplificado

A reacção de restrição com a enzima *HhaI* (Promega,USA) foi preparada em tubos de 0,2µl, de acordo com as concentrações de reagentes descritos na Tabela 4. As misturas de reacção foram sujeitas a incubação a 37°C durante 4 horas num termociclador MyCycler. Após a incubação, as amostras foram conservadas a -20°C até à separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose.

Tabela 4. Composição da mistura de reacção para a restrição do produto amplificado da região IGS do rDNA.

Reagentes	Concentração Final
Tampão <i>HhaI</i> 10X (Promega, USA)	1X
BSA, 10µg/µl (Promega, USA)	0,1mg/ml
Enzima <i>HhaI</i> , 10U/µl (Promega, USA)	2U
Produto Amplificado	10µl
ddH ₂ O	Até perfazer 20µl
Volume Total	20µl

2.4.3. Preparação das amostras e condições de electroforese

As amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 2% feito em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X (Ver em anexo), corado com 2% de brometo de etídio (10mg/ml). Foram colocados 5µl de marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, FermentasTM) num poço ao início de cada linha no gel. A electroforese decorreu durante 1h a 130V. O gel foi visualizado através de radiação ultravioleta (UV) e fotografado num sistema de documentação fotográfica UVIDOC (UVITEC).

2.4.4. PCR para detecção da mutação G119S no gene *ace-1* em *An. gambiae s.s*

Para a detecção da mutação G119S no gene *ace-1* em *An. gambiae s.s.*, foi adoptado o protocolo de Weill *et al.* (2003). Procederam-se a ensaios de PCR-RFLP, onde é realizada a amplificação por PCR de um fragmento de 541pb situado no exão 3 do gene *ace-1*, contendo o codão 119. O fragmento amplificado apresenta polimorfismos que são detectados pela enzima de restrição AluI, diferenciando os alelos resistentes e sensíveis. A composição da mistura de reacção está descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Composição das misturas de reacção de PCR para a detecção da mutação G119S no gene *ace-1* em *An. gambiae s.s.*

Reagentes	Concentração Final
Tampão 5X Green GoTaq® (Promega, USA)	1X
MgCl ₂ (25mM) (Promega, USA)	1,5mM
dNTPs (2mM) (Promega, USA)	0,2mM
Primer ExAGdir	0,4µM
Primer ExAGrev	0,4µM
Go Taq® DNA Polimerase (Promega ,USA)	0,25U
DNA <i>template</i>	1µl
ddH ₂ O	Até perfazer 25µl
Volume Total	25µl

Os programas de ciclos para detecção da mutação G119S foram: um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos seguido de 30 ciclos, cada um com uma desnaturação de 30 segundos a 94°C, *Annealing* 30 segundos a 62°C e extensão 30 segundos a 72°C. A extensão final foi feita a 72°C durante 5 minutos. Para conservação no termociclador, o programa de ciclos foi concluído a uma temperatura de 4°C.

2.4.5. Digestão enzimática

A reacção de restrição enzimática para detectar a mutação G119S no gene *ace-1* foi feita com auxílio da enzima Alu I (FermentasTM) com base na mistura de reacção descrita na Tabela 6.

Tabela 6. Composição da mistura de reacção da digestão enzimática para a detecção da mutação G119S no gene *ace-I* em *An. gambiae* s.s.

Reagentes	Concentração Final
ddH ₂ O	---
Tampão Tango 10X c\ BSA (Fermentas TM)	1X
Enzima Alu I 10U/μl (Fermentas TM)	2,5U
Produto de PCR	5μl
Volume Total	20μl

2.4.6. Preparação das amostras e condições de electroforese

Após a restrição enzimática, as amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 2% feito em tampão TBE 1X, corado com 2% de brometo de etídio (10mg/ml). Foram colocados 5μl de marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, FermentasTM) num poço ao início de cada linha no gel. A electroforese decorreu durante 1h a 130V. O gel foi visualizado através de radiação ultravioleta (UV) e fotografado num sistema de documentação fotográfica UVIDOC (UVITEC). Os resultados obtidos por esta técnica estão ilustrados na Figura 8.

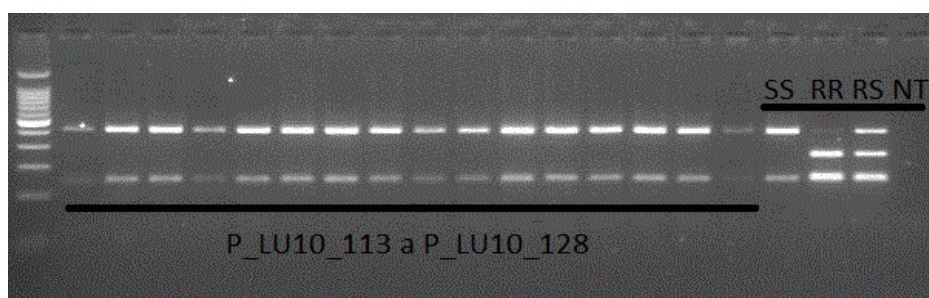


Figura 8. Fotografia de um gel de agarose a 2% para a detecção da mutação G119S na sequência *ACE-I* em *An. gambiae* s.s. P_LU10_113 a P_LU10128, são amostras de Luanda de 2010 testadas para Permetrina 0,75% Controlos positivos *ACE-I*; SS – Homozigótico sensível; RR – Homozigótico resistente; RS – Heterozigótico; NT – Controlo Negativo.

2.4.7. Genotipagem para detecção de mutações *kdr* em *An. gambiae* s.s

Foi utilizada a técnica de PIRA-PCR (*Primer Introduced Restriction Analysis*) de Janeira *et al.* (2008), para identificar as mutações L1014F e L1014S. Esta técnica baseia-se na criação de um local de restrição artificial por introdução de um *mismatch*

de nucleótido único, geralmente situado na extremidade 3' do primer, próximo da mutação de interesse (Ke *et al.*, 2002).

2.4.7.1. Detecção da mutação L1014S (TTA-TCA)

A composição da mistura de reacção para a detecção deste polimorfismo encontra-se na Tabela 7. Em cada ensaio, foram utilizados 3 controlos positivos (*i.e.* amostras homozigóticas e heterozigóticas para os alelos alternativos) e um controlo negativo (sem DNA molde).

Tabela 7. Composição da mistura de reacção de PCR para detecção da mutação *kdir* L1014S.

Reagentes	Concentração Final
ddH ₂ O	-
Tampão 5X Green GoTaq® (Promega, USA)	1X
MgCl ₂ (25mM) (Promega, USA)	2,5mM
dNTPs (2mM) (Promega, USA)	0,2mM
Primer TCA-F	0,25µM
Primer TCA-R	0,25µM
Go Taq® DNA Polimerase (Promega ,USA)	0,05U
DNA template	1µl
BSA, 10µg/µl	0,1mg/ml
Volume Total	20µl

O programa de ciclos está descrito na Tabela 8, e foi realizado num termociclador My Cycler. A conservação no termociclador foi efectuada a 4°C.

Tabela 8. Programa de ciclos de PCR para a detecção da mutação *kdir* L1014S.

	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	3min
Desnaturação	94°C	45seg
Annealing 35 ciclos	56°C	30seg
Extensão	72°C	30seg
Extensão Final	72°C	10min

2.4.7.2. Reacção de restrição enzimática

A reacção de restrição enzimática para detectar a mutação L1014S foi feita com a enzima *BspCNI* (NEB[®], Inc.) com base em misturas de reacção descritas na Tabela 9. A digestão enzimática decorreu a 25°C, durante a noite em tubos 0,2ml.

Tabela 9. Composição das misturas de reacção, de restrição enzimática, para a detecção da mutação *kdr* L1014S.

Reagentes	Concentração final
ddH ₂ O	-
Tampão NEBuffer 4 – 10X (NEB®,Inc)	1X
Factor SAM – 32 mM (NEB®,Inc)	0,32mM
BSA(100X) – 10mg/ml (NEB®,Inc)	1X
Enzima BspCNI – 2000U/ml (NEB®,Inc)	0,03U
Produto PCR	5µl
Volume total	20µl

2.4.7.3. Detecção da mutação L1014F (TTA-TTT)

A composição da mistura de reacção para a detecção deste polimorfismo encontra-se descrito na Tabela 10. Em cada ensaio, foram utilizados 3 controlos positivos (*i.e.* amostras homozigóticas e heterozigóticas para os alelos alternativos) e um controlo negativo (sem DNA molde).

Tabela 10. Composição das misturas de reacção de PCR para a detecção da mutação *kdr* L1014F.

Reagentes	Concentração Final
ddH ₂ O	-
Tampão 5X Green GoTaq® (Promega, USA)	1X
MgCl ₂ (25mM) (Promega, USA)	2,5mM
dNTPs (2mM) (Promega, USA)	0,2mM
Primer TTT-F	0,33µM
Primer TTT-R	0,33µM
BSA, 10µg/µl	0,1mg/ml
Go Taq® DNA Polimerase (Promega ,USA)	0,07U
DNA template	1µl
Volume Total	20µl

Os programas de ciclos de PCR para detecção da mutação *kdr* L1014F foram: um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos, cada um com uma desnaturação de 45s a 94°C, *Annealing* 30s a 55°C e extensão 30s a 72°C. O alongamento foi feito a 72°C durante 10 minutos e o produto amplificado foi conservado a 4°C até visualização em gel de agarose a 2% com brometo de etídio incorporado (10mg/ml) em tampão TBE 1X.

2.4.7.4. Reacção de restrição enzimática

A reacção de restrição enzimática, correu a uma temperatura de 37°C, durante a noite em tubos 0,2ml; sendo a mistura de reacção composta por: 5µl de produto amplificado, tampão *SspI*- 1X (NEB®,Inc), Enzima *SspI* – 0,05U/ml (NEB®,Inc) e ddH₂O perfazendo um volume total de 20µl.

2.4.7.5. Preparação das amostras e condições de electroforese

Para os dois ensaios de PIRA-PCR, os produtos de restrição foram separados em gel de agarose (3%) feito em tampão TBE 1X, corado com 2% de brometo de etídio (10mg/ml). Foram colocados 5µl de marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, FermentasTM) num poço ao início de cada linha no gel e foram aplicados 15µl de cada produto de restrição enzimática. A electroforese decorreu durante 1h a 130V. O gel foi visualizado através de radiação ultravioleta (UV) e fotografado num sistema de documentação fotográfica UVIDOC (UVITEC).

A Figura 9 ilustra os resultados obtidos pelos ensaios de PIRA-PCR para detectar as mutações *kdr* de *An. gambiae s.s.*

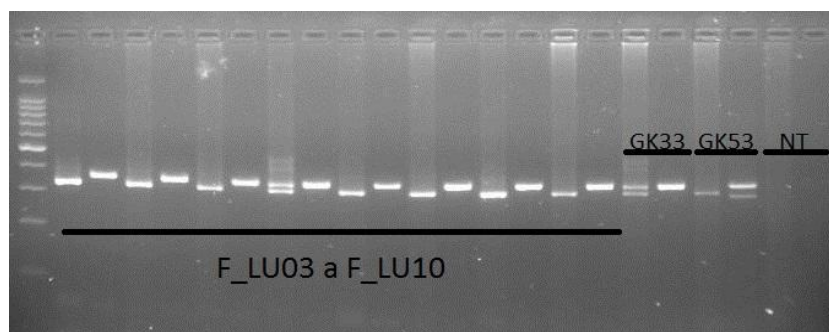


Figura 9. Fotografia de um gel de agarose a 3% para detecção do alelo *kdr* em *An. gambiae s.s.* F_LU03 a F_LU10, são amostras de Luanda de 2010 testadas para Fenitrotião. As amostras encontram-se dispostas duas-a-duas, sendo a primeira correspondente ao PIRA-PCR para detecção de L1014F (TTA-TTT) e o seguinte para L1014S. (TTA-TCA) Controlos positivos; GK33 – TTA-TTT e GK53 – TTT-TCA, NT – Controlo Negativo.

2.5. Genotipagem de Microssatélites

Neste estudo, foram genotipados um total de 11 microssatélites, localizados no cromossoma 3 de *An. gambiae* s.s. (Tabela 11). Nesta espécie, as inversões cromossômicas no cromossoma 3 são raras (Coluzzi *et al.*, 1979). Assim, a utilização de marcadores moleculares localizados neste cromossoma evita o possível enviesamento associado ao efeito das inversões cromossômicas (Lanzaro *et al.*, 1998).

Tabela 11. Loci microssatélites de *An. gambiae* analisados.

<i>Locus</i>	<i>Repeat</i>	<i>Primer</i>		<i>Tm</i>	<i>TA</i>
AG3H128	(GT)21	AG3H128-F	6-FAM-GGG GAC GGC TAG ATA AAG CG	63	56
		AG3H128-R	CCG GGC GAC ATA ACC CAC CC	67	
AG3H249	(GT)15	AG3H249-F	NED-ATG TTC CGC ACT TCC GAC AC	60	54
		AG3H249-R	GCG AGC TAC AAC AAT GGA GC	60	
AG3H119	(GT)6	AG3H119-F	HEX-GGT TGA TGC TGA AGA GTG GG	60	54
		AG3H119-R	ATG CCA GCG GAT ACG ATT CG	60	
AG3H242	(GT)8	AG3H242-F	HEX-TTC ATT TCC ACC GCA GCT GC	60	56
		AG3H242-R	GGC GAC ACT CAA TCC TTC C	60	
AG3H577	(GT)16	AG3H577-F	TTC AGC TTC AGG TTG GTC TC	58	56
		AG3H577-R	6-FAM-GGG TTT TTT GGC TGC GAC TG	60	
AG3H555	(GT)8	AG3H555-F	NED-GCA GAG ACA CTT TCC GAA AC	58	54
		AG3H555-R	TGT CAA CCC ACA TTT TGC GC	58	
AG3H59	(GT)9	AG3H59-F	HEX-CCC CTA TTA AAC CCT GGA CG	60	54
		AG3H59-R	TGT TGT TGC CCT GCG TTA CC	60	
AG3H750	(GT)8	AG3H750-F	NED-GCA AAA AAG CTT CTC CCC	54	54
		AG3H750-R	TTA GCT ACC GTC GAC GCT TC	60	
AG3H758	(GT)11	AG3H758-F	6-FAM-TGA TTT GCC AGT TCT GCC AG	58	54
		AG3H758-R	GTG ATT GGA GTG GCT AGT GG	60	
45C1	(TG)4+7+4	45C1-F	HEX-AAA AGT GGT GAC CGA GTG AC	58	54
		45C1-R	ATC TTC AAC ACT TCA GCA CG	56	
AG3H93	(GT)4+7	AG3H93-F	NED-TCC CCA GCT CAC CCT TCA AG	63	54
		AG3H93-R	GGT TGC ATG TTT GGA TAG CG	58	

Legenda: *Repeat* corresponde ao número de repetições GT existentes em cada *locus*, *Primer*: sequência dos primers para cada locus, com indicação da marcação fluorescente (6fam, NED ou HEX), **Tm**: temperatura de *melting* e **TA**: temperatura de *annealing* usada na reacção de PCR. As sequências dos *primers* foram retiradas de Zheng *et al.*, (1996), com excepção de 45C1 (Lehmann *et al.*, 1996).

2.5.1. Reacção de PCR

A reacção de amplificação foi independente para cada *locus*. Em cada um dos 11 *loci* analisados, um dos *primers* foi modificado com uma marcação fluorescente (6FAM, NED ou HEX). A composição das misturas de reacção apresenta-se na Tabela 12.

Tabela 12. Composição da mistura de reacção de amplificação dos *loci* microssatélites.

Reagentes	Concentração Final
ddH ₂ O	-
Tampão 5X Colorless GoTaq® (Promega, USA)	1X
MgCl ₂ (25mM) (Promega, USA)	1,5mM
dNTPs (2mM) (Promega, USA)	0,2mM
<i>Primer Forward</i>	0,5µM
<i>Primer Reverse</i>	0,5µM
<i>Go Taq</i> ® DNA Polimerase (Promega, USA)	0,5U
DNA <i>template</i>	1µl
Volume Total	25µl

As reacções de PCR foram realizadas em placas de 96 poços. Em cada placa, para além das amostras, foram incluídos 2 controlos positivos (amostras previamente genotipadas) e 1 controlo negativo (sem DNA molde).

O programa de ciclos de PCR encontra-se descrito na Tabela 13, sendo que a temperatura de *annealing* variou entre *loci*, de acordo com o descrito na Tabela 11. O programa de ciclos foi concluído a uma temperatura de 4°C para a conservação do produto amplificado. O produto amplificado foi posteriormente conservados a -20°C até à análise de fragmentos.

Tabela 13. Programa de ciclos de PCR dos *loci* microssatélites.

	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	3min
Desnaturação	94°C	30seg
<i>Annealing</i>	54-56°C*	35seg
Extensão	72°C	35seg
Extensão Final	72°C	10min

* Dependente do *locus*.

2.5.2. Visualização do produto de PCR

Para controlar a presença de produto amplificado, 16 amostras de cada reacção de PCR foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 2% feito em tampão TBE 1X e corado com 2% de brometo de etídio (10mg/ml). Foram aplicados 10µl do produto amplificado e, no início de cada linha no gel, 5µl de marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, FermentasTM). A corrida electroforética foi feita a 120V durante 60 minutos e o produto amplificado foi visualizado através de radiação UV e fotografado num sistema de documentação fotográfica UVIDOC (UVITEC).

2.5.3. Análise do tamanho de fragmentos

O produto amplificado obtido para os 11 *loci* foi agrupado em conjuntos de 3 a 4 *loci*, de acordo com o tamanho do fragmento e com a marcação fluorescente. As amostras para análise de fragmentos foram preparadas em microplacas de 96 poços, com 1µl de cada produto amplificado juntamente com 10µl de formamida Hi-Di (HDF, Applied Biosystems) e 0,5µl de marcador molecular interno *GeneScan – ROX500* (Applied Biosystems). As placas foram enviadas para uma empresa de biotecnologia (Yale DNA Analysis Facility) onde foram feitas análises de fragmentos em sequenciador automático (ABI3730xl, Applied Biosystems).

A análise do tamanho dos fragmentos amplificados para cada microssatélite foi feita a partir dos electroferogramas (Figura 10) produzidos no sequenciador capilar, com o auxílio do Programa GeneMarker, versão 1.4 (SoftGenetics).

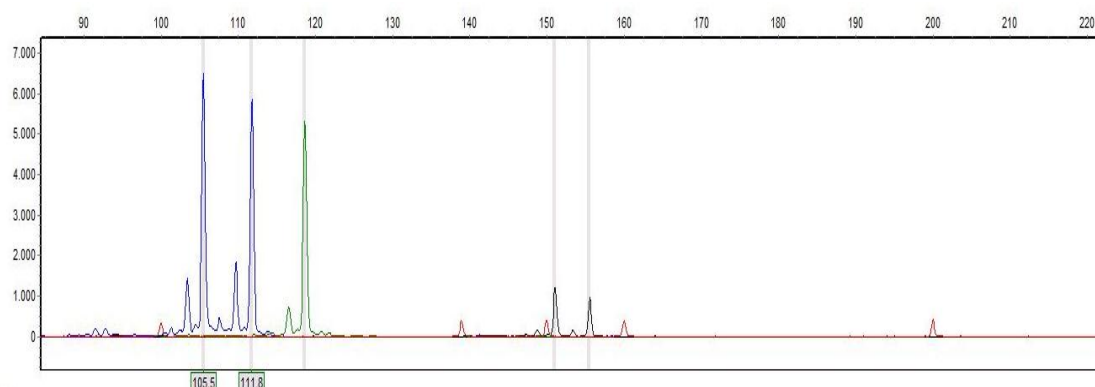


Figura 10. Electroferograma de um indivíduo *An. gambiae s.s.* O pico único representa um genótipo homozigótica, enquanto que os picos duplos representam os heterozigóticos. Os valores que aparecem em baixo de cada pico representam o tamanho do fragmento em pares de bases e o eixo vertical corresponde à altura dos picos em unidades de fluorescência relativa (RFU). Os picos de fluorescência vermelha correspondem ao marcador de tamanho molecular interno.

No electroferograma da Figura 10, o marcador interno *ROX500* aparece a vermelho, enquanto os produtos amplificados são visíveis a amarelo para o marcador *NED*, a verde para o *HEX* e a azul para o *6-FAM*.

Os genótipos de cada *locus* e para cada indivíduo foram organizados em bases de dados, no programa Microsoft Excel[®] (Microsoft), contendo os tamanhos dos alelos em pares de bases.

2.5.4. Análise dos dados genéticos

Comparações estatísticas com base em tabelas de contingência, envolvendo genótipos e fenótipos de resistência, foram efectuadas por testes de qui-quadrado ou testes exactos de Fisher, recorrendo a aplicações disponíveis *on-line* (<http://www.quantpsy.org>; <http://in-silico.net>)

Para estimar os níveis de variação genética em cada amostra analisada, foram usados os seguintes parâmetros:

Riqueza alélica – é o número médio de alelos por *locus*, ponderado pela dimensão da amostra mínima em estudo.

Heterozigotia esperada ou diversidade genética – é a frequência de heterozigotos esperada numa população, com base nas frequências alélicas, assumindo as proporções de Hardy-Weinberg (H-W).

Coefficiente de *inbreeding* ou de consanguinidade (F_{IS}) – este parâmetro mede a redução da heterozigotia de um indivíduo devido ao acasalamento não-aleatório dentro de uma subpopulação.

Estas estimativas foram obtidas recorrendo aos Programas GENEPOP v. 4.0 (Rousset, 2008) e FSTAT versão 2.9.3.2 (Goudet, 1995).

As frequências genotípicas observadas em cada *locus* foram testadas contra as expectativas do equilíbrio de H-W através de testes exactos disponíveis do *software* GENEPOP versão 4.0. (Rousset, 2008). Nestes testes, assumiu-se a hipótese nula H_0 = união aleatória de gâmetas e a hipótese alternativa H_1 = défice de genótipos heterozigóticos.

Nos testes estatísticos, o valor nominal de significância ($\alpha=0,05$) foi ajustado pela correcção de Bonferroni: $\alpha' = 1 - (1 - \alpha)^{1/n}$, de modo a evitar erros do tipo I (falsa rejeição).

O princípio de H-W assume que numa população de tamanho elevado, constituída por indivíduos diplóides, com reprodução sexuada, onde ocorrem acasalamentos aleatórios, e não existem forças evolutivas, tais como mutações, selecção natural e migração, as frequências alélicas e genotípicas permanecem estáveis ao longo das gerações, considerando-se a população como estando em equilíbrio de H-W. No caso particular deste estudo, os testes de H-W permitiram avaliar a neutralidade dos *loci* analisados, uma condição importante para a aplicação de outras estatísticas populacionais.

Os dados de microssatélites foram também utilizados para avaliar o grau de parentesco entre os indivíduos que constituíram as amostras estudadas. Para o efeito, duas abordagens foram implementadas:

1. Estimativas de medidas de parentesco genético

O Programa SPAGeDi versão 1.2 (Hardy and Vekemans, 2002) foi utilizado para calcular três medidas de parentesco entre pares de indivíduos numa dada amostra:

a) Coeficiente de coancestralidade (F): é baseado na probabilidade de dois alelos amostrados de indivíduos diferentes serem idênticos-por-descendência. Neste estudo, utilizou-se o estimador baseado num coeficiente de correlação entre estados alélicos proposto por J. Nason e descrito em Loiselle *et al.* (1995). Este coeficiente é análogo ao F_{IS} da estatística F (Hardy & Vekemans, 2002). Consoante o grau de parentesco, os valores médios esperados deste coeficiente são: 1º grau (*e.g.* pais-filhos, irmãos): 0,500; 2º grau (*e.g.* meio-irmão, avós-netos): 0,250; 3º grau (*e.g.* primos direitos): 0,125 (Blouin, 2003).

b) Coeficiente de parentesco (r): consiste na proporção de genes num indivíduo com alelos idênticos aos de um indivíduo de uma população de referência. Neste estudo calculou-se o estimador de Li *et al.* (1993) que geralmente apresenta maior precisão quando comparado com outros estimadores deste coeficiente (Hardy & Vekemans, 2002)

c) Coeficiente de fraternidade (Δ): definido para dois indivíduos diploides (i e j), é uma função da probabilidade de dois genes de i serem idênticos-por-descendência aos mesmos dois genes de j . Assim, depende dos estados alélicos de pelo menos dois genes em dois indivíduos. Um Δ positivo indica que existe

uma ligação genética dupla entre i e j . O estimador de Wang (2002) foi usado neste estudo.

2. Análise de máxima verosimilhança

O Programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006) foi utilizado para estimar o grau de relacionamento entre pares de indivíduos de uma amostra. Este programa aplica uma estatística de máxima verosimilhança para classificar o relacionamento entre pares de indivíduos em quatro classes de *pedigree*: U (*Unrelated*) são indivíduos não relacionados, HS (*Half-Sibs*) meio-irmãos, FS (*Full-Sibs*) irmãos verdadeiros e PO (*Parent-Offspring*) pais e filhos (Kalinowski, 2008).

3. RESULTADOS

Em 2009, foram prospectados um total de 79 criadouros, dos quais 17 (21,5%) foram positivos para larvas de anofelíneos. Em 2010, prospectaram-se um total de 111 criadouros mas, apesar do maior número de criadouros, apenas 9 (8.1%) foram positivos para *Anopheles*. Em geral, os criadouros consistiram de corpos de água pouco profundos, expostos à luz solar, com alguma vegetação circundante e emergente e de natureza semi-permanente, originados a partir de fugas do sistema de abastecimento de água.

3.1. Testes de resistência a insecticidas

Um total de 534 *An. gambiae* s.l. fêmea foram expostos aos insecticidas em 2009. Em 2010, o número de mosquitos expostos foi 511. Os resultados dos ensaios de susceptibilidade aos insecticidas estão apresentados na Figura 11.

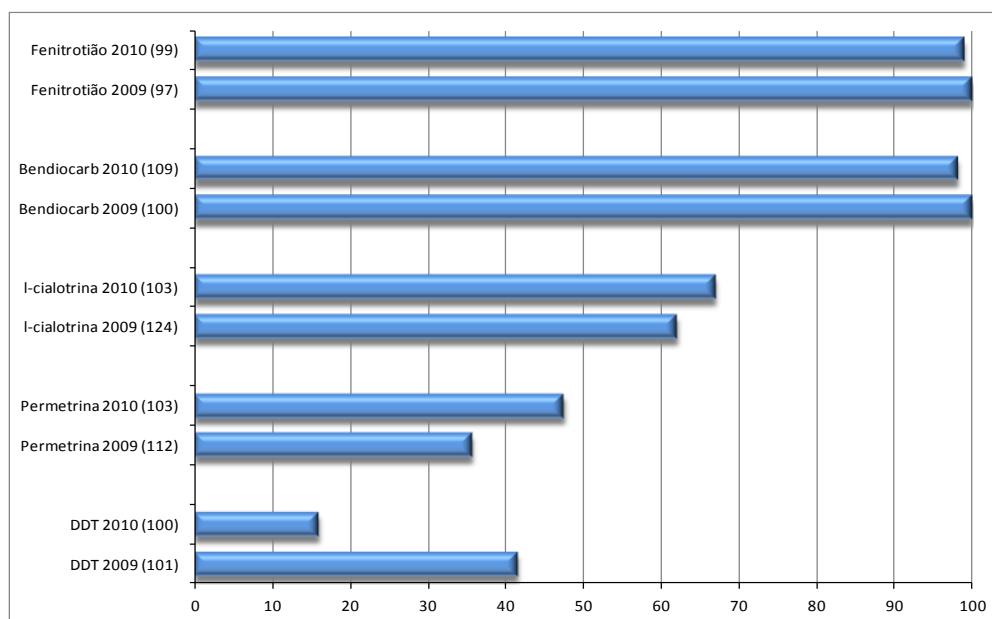


Figura 11. Taxas de mortalidade nos ensaios de susceptibilidade a insecticidas realizados em 2009 e 2010. Eixo do xx: percentagem de mortalidade; eixo dos yy: insecticida, ano de colheita e número de mosquitos testados (entre parêntesis).

Os níveis de resistência para a permetrina, DDT e λ -cialotrina foram elevados, com taxas de mortalidade inferiores a 70% (mortalidade indicadora de resistência: <80%) em ambos os anos. Em contraste, as taxas de mortalidade foram sempre acima de 98% (98,2%-100,0%) para bendiocarb e fenitrotião indicando susceptibilidade a estes insecticidas. As taxas de mortalidade foram comparáveis entre anos para cada

insecticida, com excepção do DDT, em que se observou uma diminuição significativa da mortalidade, de 41,6% a 16,0% ($\chi^2=16.02$, $df.=1$; $P<0.001$). De salientar ainda que a mortalidade nos grupos controlos foi sempre inferior a 5%, pelo que não houve necessidade de recorrer à correcção da mortalidade observada nos testes nem de eliminar testes.

3.2. Identificação de espécies e formas do complexo *Anopheles gambiae* s.l.

Um total de 582 mosquitos foram analisados pela técnica de PCR-RFLP para a identificação simultânea de espécies e formas moleculares do complexo *An. gambiae* (Fanello *et al.*, 2002). Destes, 291 mosquitos foram provenientes das colheitas e ensaios de 2009 e 291 mosquitos de 2010. A selecção dos indivíduos analisados incluiu o processamento de todos os indivíduos resistentes para cada insecticida, mais um número equivalente de indivíduos susceptíveis (Tabela 14). Todas as amostras processadas foram identificadas como *An. gambiae* s.s. forma molecular M.

Tabela 14. Número de mosquitos analisados molecularmente, por ano, insecticida e fenótipo de resistência.

	2009		2010	
	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente
Permetrina	39	74	48	55
λ -cialotrina	38	41	43	39
DDT	42	57	17	89
Total	291		291	

3.2.1. Pesquisa de mutações no gene *ACE-1*

A genotipagem do locus *ace-1* (Weill *et al.*, 2003) foi bem-sucedida para 580 (99,7%) dos 582 *An. gambiae* s.s. forma M analisados. Nos dois anos (2009: $N= 289$ e 2010: $N= 291$), observou-se que todos os indivíduos possuíam um genótipo homozigótico para o alelo selvagem (susceptível) (119G/119G ou GGC/GGC em termos de codão).

3.2.2. Pesquisa de mutações no gene *kdr*

Os resultados obtidos para a genotipagem do locus *kdr* por PIRA-PCR (Janeira *et al.*, 2008) encontram-se apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Frequências alélicas e genótípicas para o locus *kdr* de *An. gambiae* s.s. em Luanda.

Ano de colheita	N	Alelos			Genótipos		
		$f(TTA)$	$f(TTT)$		TTA-TTA	TTA-TTT	TTT-TTT
2009	291	0,150	0,850	Obs.	9	69	213
				Esp.	6,5	74,0	210,5
2010	291	0,009	0,991	Obs.		5	286
				Esp.	0,02	4,96	286,02

TTA: codão correspondente ao alelo selvagem (1014L); TTT: codão correspondente ao alelo mutante 1014F. Obs.: número observado de genótipos homozigóticos e heterozigóticos. Esp.: número de genótipos esperado de acordo com as proporções de H-W.

Em ambos os anos, foi detectada apenas a mutação L1014F no locus *kdr*. Na amostra de 2009, foram encontrados os três genótipos esperados para esta mutação, enquanto em 2010 não foram observados genótipos homozigóticos para o alelo selvagem (*i.e.* 1014L/1014L; TTA/TTA) associado à susceptibilidade a piretróides e DDT. A frequência do alelo mutante (1014F; TTT) foi bastante elevada, tendo aumentado significativamente ($\chi^2=79,359$, $df.=1$; $P<0,001$) de 85,0% em 2009 para uma situação de quase fixação em 2010 (99,1%). Nas duas amostras (2009 e 2010), não foram observados desvios significativos às frequências genótípicas esperadas pelo equilíbrio de H-W (2009: $\chi^2=0,622$; $df.=2$; $P=0,733$; 2010: não-aplicável).

Em 2009, observou-se uma associação entre genótipos homozigóticos para o alelo 1014F (*i.e.* 1014F/1014F; TTT/TTT) e o fenótipo resistente, para os insecticidas piretróides e para o DDT (Figura 12). A frequência do genótipo TTT/TTT foi significativamente superior no grupo de indivíduos com fenótipo resistente (Teste Exacto de Fisher (2-caudas): $P<0,001$ para permetrina e DDT, $P=0,032$ para λ -cialotrina). Para os três insecticidas, a frequência deste genótipo foi superior a 94,9% no grupo de insectos sobrevivente (*i.e.* resistente), enquanto no grupo de insectos sensíveis

esta frequência não ultrapassou os 42,6%. Esta análise não foi repetida em 2010, devido ao escasso número de genótipos distintos do homozigótico mutante.

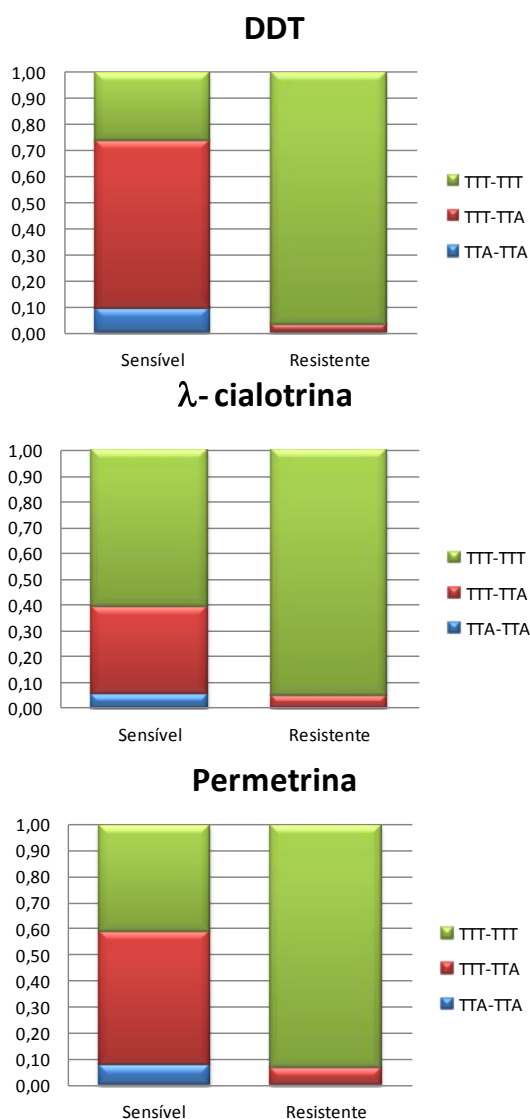


Figura 12. Distribuição de alelos *kdr* em amostras resistentes e sensíveis para insecticidas piretróides e DDT em 2009.

3.3. Análise de parentesco com base em microsatélites

Um total de 204 mosquitos foram genotipados para 11 microsatélites. Destes, 90 indivíduos foram provenientes das colheitas larvares de 2009 e 70 de 2010. Como termo de comparação, foi ainda analisada uma amostra de 44 *An. gambiae* s.s. forma M adultos fêmea, capturados em Luanda através de colheitas de mosquitos em repouso no interior das habitações, no ano de 2002. Os resultados relativos à diversidade genética por locus e amostra apresentam-se na Tabela 16. O polimorfismo dos *loci* analisados foi

elevado, com a riqueza alélica a variar entre 5 (45C1) e 20 (H128) e a heterozigotia esperada entre 0,529 (H577) e 0,862 (H249).

Dos 33 testes exactos de H-W efectuados, apenas cinco foram significativos e concentrados nos *loci* H750 (2), H128 (2) e H119 (1) (Tabela 16). Os testes significativos estão associados a valores de F_{IS} positivos e em regra elevados, sugerindo défice de heterozigóticos nestes *loci*.

Tabela 16. Estimativas de diversidade genética para os 11 *loci* microssatélites de *An. gambiae* s.s. em Luanda.

		H249	H119	H750	H93	H59	H758	H242	H577	45C1	H555	H128	Total
2009 (90)	R_s	11	6	9	6	9	11	4	6	4	6	14	8
	H_e	0,870	0,680	0,841	0,707	0,774	0,850	0,714	0,511	0,727	0,648	0,833	0,668
	F_{IS}	0,043	0,036	0,244	-0,022	0,154	0,046	-0,074	-0,109	0,007	-0,081	0,147	0,046
2010 (70)	R_s	9	8	10	6	8	10	5	5	5	6	13	8
	H_e	0,839	0,680	0,836	0,655	0,784	0,845	0,719	0,574	0,739	0,551	0,832	0,732
	F_{IS}	0,013	0,096	0,505	0,215	0,180	0,022	-0,172	-0,095	0,033	-0,062	0,107	0,087
2002 (44)	R_s	8	6	10	7	8	11	6	6	4	4	14	8
	H_e	0,863	0,627	0,801	0,762	0,681	0,85	0,767	0,492	0,698	0,646	0,888	0,734
	F_{IS}	-0,132	-0,039	0,303	0,045	-0,123	-0,042	-0,061	0,168	-0,033	0,191	0,181	0,039
Total	R_s	14	9	11	8	11	14	7	8	5	6	20	10
	H_e	0,862	0,672	0,833	0,725	0,765	0,852	0,731	0,529	0,724	0,618	0,851	0,742
	F_{IS}	-0,001	0,047	0,349	0,100	0,118	0,022	-0,099	-0,047	0,007	-0,008	0,148	0,069

Legenda: R_s : riqueza alélica, H_e : heterozigotia esperada; F_{IS} : coeficiente de consanguinidade. 2009: amostra proveniente de colheita de larvas em 2009; 2010: amostra proveniente de colheita de larvas em 2010; 2002: amostra proveniente de colheita de adultos em 2002. Em negrito: locus com teste exacto de H-W significativo (após correcção de Bonferroni, ver Métodos).

Para a análise do parentesco entre indivíduos, foram estimados os coeficientes de coancestralidade (F), parentesco (r) e fraternidade (Δ), para cada amostra analisada, bem como para subamostras definidas de acordo com o genótipo no locus *kdr* e fenótipo de resistência. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 17.

De um modo geral, os valores obtidos para os estimadores de parentesco não sugerem um grau de parentesco entre os indivíduos que constituem cada amostra. Os valores dos coeficientes F foram sempre inferiores a 0,250, o valor de referência para uma relação de 3º grau (*e.g.* primos diretos) (Blouin 2003). De igual modo, os valores de r foram perto de zero (-0,0191 a 0,0889), indicando que a maioria dos indivíduos são

não-relacionados. Os coeficientes de fraternidade foram também na maioria negativos, indicando uma ausência de associação entre alelos de dois *loci* diferentes nos pares de indivíduos de cada amostra.

Tabela 17. Estimativas de coeficientes de parentesco em amostra de *An. gambiae* s.s. de Luanda.

	Amostra	N	F	r	Δ
Amostras totais por ano de colheita	2009	90	0,0463	-0,0108	-0,0194
	2010	70	0,0872	-0,0191	-0,0334
	2002	44	0,0402	-0,0068	-0,0109
Genótipos <i>kdr</i> em 2009	TTA-TTA	10	0,0158	0,0007	-0,0131
	TTA-TTT	30	0,0275	-0,0038	-0,0127
	TTT-TTT	50	0,0649	-0,0169	-0,0277
Genótipos <i>kdr</i> em 2010	TTA-TTT	5	-0,0903	0,0889	0,1321
	TTT-TTT	65	0,0835	-0,0177	-0,0335
Fenótipos de resistência em 2009	Sensível	44	0,0442	-0,0132	-0,0209
	Resistente	46	0,0477	-0,0079	-0,0191
Fenótipos de resistência em 2010	Sensível	31	0,0859	-0,0147	-0,0310
	Resistente	39	0,0861	-0,0180	-0,0351

Legenda: N-tamanho da amostra; F-coeficiente de coancestralidade (Loiselle *et al.*, 1995); r-coeficiente de parentesco (Li *et al.*, 1993); Δ-coeficiente de fraternidade (Wang, 2002).

O reduzido grau de parentesco entre indivíduos foi confirmado pela análise de máxima-verossimilhança implementada pelo programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006). De acordo com a análise da Figura 13, a proporção de indivíduos não relacionados foi sempre bastante elevada (>85%) em todas as comparações. Em termos de grau de parentesco, foram identificadas relações de 1º grau em 10% da subamostra de indivíduos homozigóticos para o alelo *kdr* 1014F (TTT). Este grupo foi o que evidenciou uma maior proporção de indivíduos aparentados, com também 10% de parentes de 2º grau.

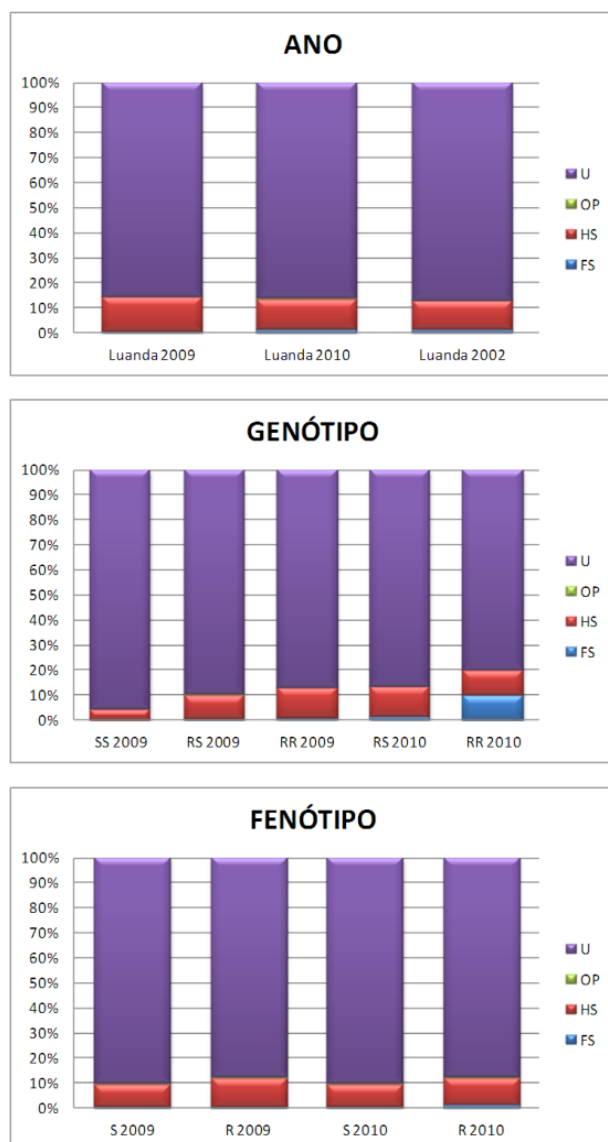


Figura 13. Proporção de classes de *pedigree* determinadas pelo programa ML-RELATE para as amostras de *An. gambiae s.s.* de Luanda. U: não relacionado; OP: pais-filhos; HS: meio-irmão; FS: irmão. **Genótipos *kdr*:** SS – TTA/TTA; RS – TTA/TTT; RR: TTT/TTT. **Fenótipos:** S – sensível; R – resistente.

4. DISCUSSÃO

4.1. Níveis de resistência aos insecticidas

É cada vez maior o número de estudos que reportam o surgimento de resistências em mosquitos vectores, em várias partes do globo. Na África Ocidental, já se tem relatos de resistências de *An. gambiae* s.l. às 4 classes de insecticidas (carbamatos, organoclorados, organofosfatos e piretróides) usados nos programas de controlo vectorial (Chandre *et al.*, 1999a; Kristan *et al.*, 2003; Djogbénou *et al.*, 2008). Assim, permanecendo a aplicação de insecticidas uma das estratégias de controlo vectorial mais usada, é fundamental a monitorização e avaliação regular da resistência aos insecticidas (Hemingway *et al.*, 2004). Neste contexto, e sendo Angola um país endémico para a malária, têm sido efectuados alguns esforços para um maior conhecimento do actual problema da resistência aos insecticidas, desde o alcance da paz em 2002 (Cuamba *et al.*, 2006, Cardoso 2007). De um modo geral estes estudos apontam para baixos níveis de resistência em *An. gambiae* s.s. e, com excepção do norte do país (Cabinda), também frequências baixas de mutações *kdr* (Santolamazza *et al.*, 2008).

Neste estudo realizado na Província de Luanda, os resultados apontam para uma elevada sensibilidade de *An. gambiae* s.s. aos insecticidas fenitrotião e bendiocarb, com taxas de mortalidade acima dos 98%. No entanto, foi observada uma reduzida susceptibilidade nos 2 anos de estudo (2009 e 2010), aos insecticidas DDT, permetrina e λ -cialotrina. Estes achados concordam com estudos realizados em alguns países Africanos, em que foram observados elevados níveis de sensibilidade a insecticidas carbamatos e organofosfatos, e uma sensibilidade reduzida aos insecticidas DDT e piretróides (Djègbè *et al.*, 2011; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2011).

As taxas de mortalidade obtidas para DDT e piretróides foram consistentemente abaixo dos 80%, que é um indicador de uma população resistente pelos critérios da OMS (WHO, 1998). Os insecticidas piretróides são actualmente os mais utilizados em Angola no controlo de vectores de malária. Os piretróides têm sido utilizados pelo PNCM em redes mosquiteiras impregnadas de longa duração (LLIN) com deltametrina, que têm uma distribuição nacional. Também têm sido realizadas pulverizações intra-domiciliares com λ -cialotrina em algumas províncias (Cunene, Huambo, Huíla, Cabinda, Malange, Kwanza Norte, Benguela, Namibe e Zaire).

Relativamente ao DDT, a sua utilização no país para o controlo da malária foi interrompida definitivamente em 1989, não havendo também registos sobre a sua utilização na agricultura desde 1985 (Cani P., PNCM, Ministério da Saúde; comunicação pessoal). No entanto, este foi o insecticida que obteve as mais baixas taxas de mortalidade. O elevado nível de resistência observado para o DDT neste estudo leva assim a supor que a selecção da resistência a este insecticida terá ocorrido ainda durante o período colonial, possivelmente associado a programas de erradicação da malária ou ao uso intensivo do mesmo no combate de pragas na agricultura (Akogbeto *et al.*, 2005). Em Angola, o DDT foi extensivamente utilizado no período colonial em todas as províncias no programa de erradicação de malária, com particular incidência nos anos de 1950-1960 (Cambournac *et al.*, 1956).

É importante também salientar que o surgimento de resistências aos insecticidas em mosquitos vectores nem sempre está associado à aplicação dos mesmos durante o controlo vectorial, podendo ser resultado do uso massivo de pesticidas na agricultura ou também de insecticidas domésticos (Diabaté *et al.*, 2002; Braga & Valle, 2007; Morrison *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2012). Estudos recentes sobre a adaptação de *An. gambiae* em ambientes urbanos, têm sugerido que a poluição desempenha um papel importante na selecção de resistências aos insecticidas durante a fase do desenvolvimento larvar (Awolola *et al.*, 2007; Djouaka *et al.*, 2007; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2011). Assim, os elevados níveis de resistência aos insecticidas DDT e piretróides observados em Luanda podem ser resultado de uma combinação de factores, desde o uso histórico do DDT à elevada pressão selectiva imposta pela poluição urbana.

4.2. Identificação molecular do complexo *Anopheles gambiae*

A identificação molecular das amostras colhidas nos dois anos de estudo em Luanda revelou a presença de uma única espécie e forma molecular do complexo *An. gambiae*, nomeadamente *An. gambiae* s.s. forma molecular M. Este resultado está de acordo com estudos anteriores realizados na região (Cuamba *et al.*, 2006; Cardoso 2007; Calzetta *et al.*, 2008). Estes trabalhos apontam para uma presença exclusiva da forma M de *An. gambiae* s.s. na Província de Luanda, ocorrendo por vezes em simpatria com *An. melas* em áreas mais costeiras (*e.g.* Cacuaco) (Calzetta *et al.*, 2008). Dos estudos anteriores, apenas por uma ocasião foi identificado *An. arabiensis* na cidade de

Luanda (Cuamba *et al.*, 2006). A predominância da forma M numa região fortemente urbanizada como Luanda concorda com o que se conhece sobre a ecologia das formas moleculares de *An. gambiae* s.s. (della Torre *et al.*, 2005; Lehmann & Diabaté, 2008). Esta forma é considerada como sendo mais adaptada a ambientes urbanos e com forte pressão humana, onde tende a explorar criadouros permanentes ou semi-permanentes, de natureza antropogénica.

Os estudos anteriores sobre a distribuição de *An. gambiae* s.l. em Angola sugerem uma distribuição não uniforme das formas moleculares de *An. gambiae* s.s. A forma M parece dominar na província de Luanda e nas províncias mais ao sul e costeiras (Luanda, Bengela, Lobito e Namibe), enquanto que a forma S predomina no norte do país (Cabinda, Zaire) e interior norte/centro (Lunda Sul, Malange, Kuanza Norte) (Cuamba *et al.*, 2006; Cardoso 2007; Calzetta *et al.*, 2008). No entanto, estes estudos podem ainda considerar-se preliminares devido ao número relativamente reduzido de locais amostrados e de indivíduos analisados, pelo que mais estudos serão necessários para se obter um mapa mais detalhado da distribuição dos membros do complexo *An. gambiae* em Angola.

4.3. Base genética da resistência

A importância da subdivisão populacional em *An. gambiae* s.s. tem a sua maior expressão na distribuição de genes associados à resistência a insecticidas. A frequência de mutações associadas à resistência *kdr* é bastante elevada em populações da forma S na África ocidental. No entanto, estas mutações são menos frequentes em populações da forma M, mesmo quando as duas formas ocorrem em simpatria (Chandre *et al.*, 1999b; Santolamazza *et al.*, 2008). Estudos recentes demonstraram que as duas mutações *kdr* descritas em *An. gambiae* s.s. (L1014F e L1014S) terão tido múltiplas origens em cada forma molecular e que fenómenos de introgressão genética, embora raros, terão contribuído para a transferência dos alelos associados à resistência entre formas (Weill *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2007; Etang *et al.*, 2009).

Neste estudo, foi detectada apenas uma das duas mutações *kdr* descritas em *An. gambiae* s.s., nomeadamente a mutação L1014F, em duas amostras temporais de *An. gambiae* s.s. forma M na província de Luanda. Embora a ocorrência deste alelo *kdr* na forma M seja um evento pouco frequente, este não é um achado único. A presença da

mutação L1014F foi já anteriormente observada no Benin, Burkina Faso, Camarões, Nigéria e Guiné Equatorial (Akogbeto & Yakoubou, 1999; Weill *et al.*, 2000; Diabaté *et al.*, 2002; Reimer *et al.*, 2005; Etang *et al.*, 2006; Djogbénou *et al.*, 2011; Oduola *et al.*, 2012). Estes estudos apontam não só para fenómenos de introgressão genética a partir da forma S mas também de casos de origem independente desta mutação em populações da forma M. Serão necessárias mais análises, nomeadamente baseadas na sequenciação de regiões genómicas adjacentes ao locus *kdr*, para se avaliar a origem da mutação L1014F nas populações de *An. gambiae* s.s. forma M de Luanda.

A ocorrência de elevados níveis de resistência ao DDT e a insecticidas piretróides, que partilham o mesmo modo de acção (inibição dos canais de sódio do sistema nervoso), detectada através dos ensaios OMS, fazia supor a ocorrência de um mecanismo de resistência partilhado pelas duas classes de insecticidas. Esta hipótese foi comprovada pela detecção de uma elevada frequência da mutação L1014F nas amostras analisadas. As frequências do alelo 1014F registadas (2009: 85,0%; 2010: 99,1%) estão entre as mais elevadas das que já foram reportadas para a forma M, sendo apenas comparáveis com algumas populações do Burkina Faso e do Benim (Santolamazza *et al.*, 2008; Djouaka *et al.*, 2008; Dabiré *et al.*, 2009). O papel da mutação *kdr* na resistência foi também reforçado pela correlação significativa detectada entre os genótipos homozigóticos recessivos para a mutação e os fenótipos de resistência para o DDT e os dois piretróides testados, na amostra de 2009. Assim, foi evidente uma associação entre as mutações *kdr* e a resistência aos insecticidas DDT e piretróides, tal como seria de esperar para uma característica recessiva, como já foi demonstrado em outros trabalhos (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Chandre *et al.*, 2000b; Ranson *et al.*, 2000a). No entanto, nem sempre esta correlação foi encontrada em estudos de outras populações. Existem registos de populações de *An. gambiae* s.s. com elevados níveis de resistência a piretróides e DDT mas com frequências *kdr* muito baixas (Djouaka *et al.*, 2008). Estes trabalhos demonstram a ocorrência de outros mecanismos de resistência em *An. gambiae* s.s., entre os quais se destacam os mecanismos de resistência metabólica atribuídos à expressão alterada de enzimas do grupo das citocromo P450 monooxigenases e das carboxilesterases. Deve-se notar ainda a ocorrência de mecanismos múltiplos de resistência em algumas populações de *An. gambiae* s.s., nomeadamente resistência *kdr* e metabólica (Djouaka *et al.*, 2008; Awolola *et al.*, 2009;

Koekemoer *et al.*, 2011). Estes dados apontam para a importância de complementar os dados existentes para a população de Luanda, com análises de mecanismos de resistência metabólica.

No que diz respeito às restantes classes de insecticidas, não foram encontradas evidências de resistência a carbamatos ou organofosfatos na população de *An. gambiae* s.s. de Luanda. As taxas de mortalidade para estes insecticidas foram acima de 98% e também não se detectaram mutações no *locus ace-1*, associado à resistência a insecticidas destas classes. Este resultado é de importância para os programas de controlo da malária, tendo em conta que estes insecticidas têm sido vistos como alternativas aos piretróides, como parte de uma estratégia de gestão das resistências (Djèrontin *et al.*, 2009; Akogbéto *et al.*, 2010). No entanto, e apesar de menos estudadas, foram já descritas na África ocidental algumas populações com mutações *ace-1* associadas à resistência a estes insecticidas (Dabiré *et al.*, 2009; Djogbénou *et al.*, 2011).

4.4. Análise de parentesco

A suspeita de uma influência do método de amostragem de imaturos, utilizado neste estudo, nas elevadas taxas de resistência e frequências *kdr* observadas, bem como no aumento observado na frequência da mutação L1014F e na resistência ao DDT entre 2009 e 2010, não foi confirmada pelas análises de parentesco. As estimativas dos coeficientes de coancestralidade, parentesco e fraternidade obtidas para as amostras de cada ano e para subamostras definidas de acordo com o genótipo no locus *kdr* e fenótipo de resistência, foram na sua maioria negativos ou perto de zero, indicando uma ausência de associação genética entre pares de indivíduos. De igual modo, os valores obtidos para as amostras provenientes de larvas em 2009 e 2010 foram semelhantes às obtidas na amostra de mosquitos capturados na fase adulta em 2002.

Também a análise de máxima verosimilhança implementada pelo programa ML-RELATE revelou baixas proporções de indivíduos com até 2º grau de parentesco e comparáveis com a amostra de adultos. Assim, e apesar de se ter observado um ligeiro aumento do nível de parentesco entre indivíduos (*e.g.* índice de coancestralidade (*F*): 2009 = 0,05, 2010 = 0,09; Tabela 17), este fenómeno não parece ser suficiente para explicar o aumento da frequência das mutações *kdr* de 2009 para 2010. A comparação

entre amostras larvares e amostras adultas dos parâmetros de grau de parentesco e dos índices de diversidade genética, sugerem que ambos os métodos de colheita (*i.e.* imaturos e adultos) resultaram em amostras igualmente representativas da população de *An. gambiae* s.s. em estudo. Neste contexto, seria interessante avaliar a frequência de mutações *kdr* na amostra de adultos colhidos em 2002. Esta análise, poderá servir para avaliar a evolução destas mutações ao longo de um intervalo de tempo cerca de 7 anos, de modo a determinar o efeito de pressões selectivas neste gene.

5. CONCLUSÕES

Este estudo proporcionou importantes informações no que concerne ao estado da susceptibilidade do vector *An. gambiae* s.s., na província de Luanda. Os níveis de resistência foram elevados para os insecticidas piretróides e DDT. Foi encontrada a mutação L1014F no locus *kdr* e com frequência bastante elevada do alelo mutante. Foi evidente uma associação entre as mutações *kdr* e a resistência aos insecticidas DDT e piretróides, tal como seria de esperar para uma característica recessiva (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Chandre *et al.*, 2000; Ranson *et al.*, 2000a). Por outro lado, não foram encontradas evidências de resistência a carbamatos ou organofosfatos, e também não foi detectada a mutação no gene *ace-1* que confere resistência a estes insecticidas. Os resultados obtidos neste estudo poderão servir de base para seguir a evolução das resistências aos insecticidas na província de Luanda. Também deverão ser tidos em conta na avaliação do impacto das estratégias de controlo vectorial em curso, bem como apoiar o manejo do uso de insecticidas naquela região. Finalmente, estes resultados realçam ainda a necessidade de se implementarem estudos idênticos nas restantes províncias de Angola, que tiveram uma grande pressão de DDT até 1974, sendo que algumas continuam a ter campanhas regulares de pulverização intradomiciliar com piretróides (lambdacialotrina), como o Huambo, Huila e Cunene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akogbeto, M. & Yakoubou, S., 1999. Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets in Benin, West Africa. *Bulletin de la Société Pathologie Exotique*, 92(2), pp. 123-130.

Akogbeto, M.C., Djouaka, R., Noukpo, H., 2005. Use of agricultural insecticides in Benin. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 98(5), pp. 400-405.

Akogbeto, M.C., Padonou, G.G., Gbénou, D., Irish, S., and Yadouleton, A., 2010. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malaria Journal*, [e-journal] 9. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-2875-9-204.pdf> [acedido a 7 de Julho de 2011].

Antonio-Nkondjio, C., Fossog, B.T., Cyrille Ndo, C., Djantio, B.M., Togouet, S.Z., Awono-Ambene, P., Costantini, C., Wondji, C.S. and Ranson, H., 2011. *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*, [e-journal] 10. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-2875-10-154.pdf> [acedido a 23 de Janeiro de 2012].

Awolola, T., Oduola, A., Obansa, J., Chukwurar, N. and Unyimadu, J., 2007. *Anopheles gambiae* s.s. breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44, pp. 241-244.

Awolola, T.S., Oduola, O.A., Strode, C., Koekemoer, L.L., Brooke, B. and Ranson, H., 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103(11), pp. 1139-1145.

Awolola, T.S., Oyewole, I.O., Amajoh, C.N., Idowu, E.T., Ajayi, M.B., Oduola, A., Manafa, O.U, Ibrahim, K., Koekemoer, L.L., and Coetzee, M., 2005. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria, *Acta Tropica*, 95(3), pp. 204-209.

- Ayala, F.J., Escalante, A.A., Lal, A.A., and Rich, S.M., 1998. Evolutionary relationships of human malaria parasites. In Sherman, I.W. (1998). *Malaria – Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. pp. 285-300.
- Black, W.C. & Moore, C.G., 1996. Population biology as a tool for studying vector borne diseases. In Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. (1996). *The biology of disease vectors*. Utah: University Press of Colorado.
- Blouin, M.S., 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(10), pp. 503-511.
- Bourguet, D., Capela, R. and Raymond, M., 1996. An Insensitive Acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Portugal. *Journal of Economic Entomology*, 89(5), pp. 1060–1066.
- Braga, I. A. & Valle, D., 2007. *Aedes Aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. *Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília*, 16(4), pp. 279-293.
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C., 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), pp.605-613.
- Calderon, G., 1995. Chave para identificar espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicinae, Anophelinae) del Peru (adultos hembras). *Revista Peruana de Entomologia*, 37, pp. 32-35.
- Calderon, G., Fernandez, R. and Valle, J., 1995. Especies de la fauna anofelina, su distribucion y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Peru. *Revista Peruana de Epidemiologia*, 8(1), pp. 5-23.
- Cambournac, F.J., Gandara, A.F. and Casaca, V.M., 1956. Malaria prevention by the application of insecticides of residual action on the rural area south of Angola. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 13, 361-70.
- Calzetta, M., Santolamazza, F., Carrara, G.C., Cani, P.J., Fortes, F., Di Deco, M.A, della Torre, A. and Petrarca, V., 2008. Distribution and chromosomal characterization

of *Anopheles gambiae* complex in Angola. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(1), pp. 169-175.

Caputo, B., Nwakanma, D., Jawara, M., Adiamoh, M., Dia, I., Konate, L., Petrarca, V., Conway, D.J., and della Torre, A., 2008. *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s. *Malaria Journal*, [e-journal] 7, Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/7/1/182> [acedido a 6 de Abril de 2011].

Cardoso, Y., 2007. *Resistência “Knockdown” a insecticidas em populações de Anopheles gambiae Gilles, 1902 de Angola, África Austral*. Tese de mestrado. Universidade de Lisboa, pp. 54.

Carrara, G.C., Santolamazza, F., Fanello, C., Cani, P.J., della Torre, A. and Petrarca, V., 2002. Preliminary data on Anopheline malaria vectors at two sites of Western Angola. *Parassitologia*, 44, pp. 43.

Chandre, F., Darrier, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J. and Guillet, P., 1999a. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization*, 77, pp. 230-234.

Chandre, F., Manguin, S., Brengues, C., Dosou-yoyo, J., Darriet, F., Diabate, A., Carnevale, P. and Guillet, P., 1999b. Current distribution of pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form. *Parassitologia*, 41(1-3), pp. 319-322.

Chandre, F., Darriet, F., Duchon, S., Finot, L., Manguin, S., Carnevale, P. and Guillet P., 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, pp. 14, pp. 81-88.

Charlwood, J.D., Pinto, J., Sousa, C.A., Ferreira, C., Petrarca, V., and do Rosario, V., 2003. “A mate or a meal” – Pre-gravid behaviour of female *Anopheles gambiae* from the islands of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Malaria Journal*, [e-journal] 2(9). Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/2/1/9/> [acedido a 14 de Dezembro de 2011].

CIA – The World Factbook: Angola. Disponível em: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ao.html> [acedido a 31-08-2012]

Coetzee, M., 2004. Editorial distribution of the african malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2), pp. 103-104.

Coetzee, M., Craig, M. and Le Sueur, D., 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*, 16(2), pp. 74–77.

Collins, F.H., Kamau, L., Ranson, H.A., and Vulule, J.M., 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(?), pp. 1412 -1423.

Coluzzi, M., 1994. Malaria and the Afrotropical Ecosystems: Impact of Man-Made Environmental Changes. *Parassitologia*, 36(1-2), pp. 223-227.

Coluzzi, M., Sabatini, A., della Torre, A., Di deco, M.A. and Petrarca, V., 2002. Apolytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298(5597), pp. 1415-1418.

Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V. and Di Deco, M.A., 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 73(5), pp. 483-497.

Constantini, C., Sagon, N.F., della Torre, A. and Coluzzi, M., 1999. Mosquito behavioural aspects of vector human interactions in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 41(1-3), pp.209-217.

Cuamba, N. & Mendis, C., 2009. The role of *Anopheles merus* in malaria transmission in an area of southern Mozambique. *Journal of Vector Borne Diseases*, 46, pp. 157-59.

Cuamba, N., Choi, K.S. and Townson, H., 2006. Malaria Vectors in Angola: distribution of Species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex, their Pyrethroid insecticide Knockdown resistance (kdr) Status and *Plasmodium falciparum* Sporozoite rates. *Malaria Journal*, [e-journal] 5(2). Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-2875-5-2.pdf> [acedido a 6 de Abril de 2011].

Dabiré, K.R., Diabaté, A., Namontougou, M., Djogbenou, L., Kengne, P., Simard, F., Bass, C., and Baldet, T., 2009. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa). *Tropical Medicine & International Health*, 14(4), pp. 396-403.

della Torre, A., Costantini, C., Besansky, N. J., Caccone, A., Petrarca, V., Powell, J. R. and Coluzzi, M., 2002. Speciation within *Anopheles gambiae* – the glass is half full. *Science*, 298, pp. 115-117.

della Torre, A., Fanello, C., Akogbeto, M., Dossou-yovo, J., Favia, G., Petrarca, V. and Coluzzi, M., 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology*, 10(1), pp. 9–18.

della Torre, A., Tu, Z., and Petrarca, V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7), pp. 755-769.

Diabaté, A., Baldet, T., Chandre, F., Guiguemdé, R.T., Brengues, C., Guillet, P., Hemingway, J. and Hougard, J.M., 2002. First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* 44(3-4), pp. 157-158

Djègbè, I., Boussari, O., Sidick, A., Martin, T., Ranson, H., Chandre, F., Akogbéto, M. and Corbel, V., 2011. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malaria Journal*, 10(1). Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/10/1/261/> [acedido a 11 de Dezembro de 2011].

Djènontin, A., Chabi, J., Baldet, T., Irish, S., Pennetier, C., Hougard, J.M., Corbel, V., Akogbeto, M. and Chandre, F., 2009. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malaria Journal*, [e-journal] 8. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-2875-8-233.pdf> [acedido a 6 de Abril de 2011].

Djogbénou, L., Dabire, R., Diabate, A., Kengne, P., Akogbeto, M., Hougard, J.M., Chandre, F., 2008. Identification and geographic distribution of the ACE-1R mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(2), pp. 298-302.

Djogbénou, L., Pasteur, N., Akogbéto, M., Weill, M. and Chandre, F., 2011. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(3), pp. 256-267.

Djogbénou, L., Weill, M., Hougard, J.M., Raymond, M., Akogbeto, M. and Chandre, F., 2007. Characterization of Inseticide Acetylcholinesterase (*ace-1*) in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Resistance Levels and Dominance. *Journal of Medical Entomology*, 44(5), pp. 805-810.

Djouaka, R., Bakare, A., Bankole, H., Doannio, J., Coulibaly, O., Kossou, H., Tamo, M., Basene, H., Popoola, O. and Akogbeto, M., 2007. Does the spillage of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance? *Malaria Journal*, [e-journal] 6. Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/6/1/159> [acedido a 6 de Abril de 2011].

Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Coulibaly, O.N., Akogbeto, M.C., Ranson, H., Hemingway, J. and Strode, C., 2008. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*, [e-journal] 9. Disponível em: <http://w01.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-9-538.pdf> [acedido a 6 de Abril de 2011].

Donnelly, M.J., Cuamba, N., Charlwood, J.D., Collins, F.H. and Townson, H., 1999. Population structure in the malaria vector, *Anopheles arabiensis* Patton, in East Africa. *Heredity*, 83, pp. 408-417.

Etang, J., Fondjo, E., Chandre, F., Morlais, I., Brengues, C., Nwane, P., Chouaibou, M., Ndjemai, H. and Simard, F., 2006. First report of knockdown resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(5), pp. 795-797.

Etang, J., Manga, L., Chandre, F., Guillet, P., Fondjo, E., Mimpfoundi, R., Toto, J.C. and Fontenille D., 2003. Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 40(4), pp. 491-497.

Etang, J., Vicente, J.L., Nwane, P., Chouaibou, M., Morlais, I., Do Rosario, V.E., Simard, F., Awono-Ambene, P., Toto, J.C. and Pinto, J., 2009. Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Molecular Ecology*, 18(14), pp. 3076-3086.

Fanello, C., Petrarca, V., della Torre, A., Santolamazza, F., Dolo, G., Coulibaly, M., Allouche, A., Curtis, C.F., Touré, Y.T. and Coluzzi, M., 2003. The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s.. *Insect Molecular Biology*, 12(3), pp. 241-245.

Fanello, C., Santolamazza, F. and della Torre, A., 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCRRFLP. *Medical and veterinary Entomology*, 16(4), pp. 461-64.

Faust, E.C., Beaver, P.C. e Jung, R.C., 1975. *Agentes e vectores animais de doenças humanas*. 4ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 626.

Favia, G., della Torre, A., Bagayoko, M., Lanfrancotti, A., Sagnon, N'F., Touré, Y.T. and Coluzzi, M., 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of

Anopheles gambiae and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Molecular Biology*, 6, pp. 377-383.

Fortes, F., 2011. *Perfil epidemiológico das principais doenças parasitárias endémicas em Angola (Malária, Tripanossomose Humana Africana, Oncocercose, Shistosomose Urinária)*. Tese de Doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. pp. 173.

Garnham P.C.C, 1985. Rechutes dans la Malaria: Revue des travaux récents (Reveu d'actualité). *Annales de la Société Belge de Médecine Topicale*, 65(3), pp. 233-242.

Georghiou, G. P., 1972. The evolution of resistance to pesticides. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3, pp. 133-168.

Gilles, H.M., & Warrell, D.A., 1993. *Bruce-chawatt's essential malariology*. 3rd Edition. London: Hodder Arnold. pp. 340.

Gillies, M.T. & Coetzee, M., 1987. *A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara*. Johannesburg: South African Institute for Medical Research. pp. 143.

Gillies, M.T. & DE Meillon, B., 1968. *The Anophelinae of Africa south of the Sahara*. 2nd Edition. Johannesburg: South African Institute for Medical Research. pp. 343.

Goldberg, C.S. & Waits, L.P., 2010. Quantification and reduction of bias from sampling larvae to infer population and landscape genetic structure. *Molecular Ecology Resources*, 10(2), pp. 304-313.

Goodman, J., 1998. Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (*Phoca vitulina vitulina*) revealed using microsatellite DNA polymorphisms. *Molecular Biology and Evolution*, 15(2), pp. 104-118.

Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-Statistics. *The Journal of Heredity*, 86(6), pp. 485-486.

Hardy, O. J. & Vekemans, X., 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, pp. 618-620.

Hemingway, J. & Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45, pp. 371-391.

Hemingway, J. 2005. Control of insects and acarines. In Marquardt *et al.*, 2nd Edition (2005). *Biology of disease vectors*. London: Elsevier Academic Press. pp. 625-637.

Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. and Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), pp. 653-665.

Hunt, R.H., Coetzee M. and Fettene M., 1998. The *Anopheles gambiae* complex: A new species from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(2), pp. 231-235.

Jacob, B.G., Shililu, J., Mwangangi, J.M., Muriu, S.M., Funes, J., Githure, J., Regens, J.L. and Novak, R.J., 2006. Spatial targeting *Culex quinquefasciatus* aquatic habitats on modified land cover for implementing on Integrated Vector Management (IVM) program in three villages within the Mwea Rice Scheme Kenya. *International Journal of Health Geographics*, [e-journal] 5. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1476-072x-5-18.pdf> [acedido a 15 de Maio de 2011].

Janeira, F., Vicente, J. L., Kanganje, Y., Moreno, M., do Rosário, V. E., Cravo, P., and Pinto, J., 2008.. A Primer-Introduced Restriction Analysis-Polymerase Chain Reaction Method to Detect Knockdown Resistance Mutations in *Anopheles gambiae*. *Journal of Medical Entomology*, 45(2), pp. 237-241.

Jarne, P. & Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), pp. 424-29.

Jones, C.M., Sanou, A., Guelbeogo, W.M., Sagnon, N., Johnson, P. and Ranson, H., 2012 Aging partially restores the efficacy of malaria vector control in insecticide-resistant populations of *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso. *Malaria Journal*, [e-journal] 11. Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-11-24.pdf> [acedido a 3 de Fevereiro de 2012].

Kalinowski, S.T., 2008. User's Manual for *ML-Relate*. Disponível em: <http://www.montana.edu/kalinowski/ML-Relate/ML-Relate%20-%20UserManual.pdf> [acedido a 18 de Maio de 2012]. pp. 8.

Kalinowski, S.T., Wagner, A.P. and Taper, M.L., 2006. *ML-Relate*: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), pp. 576-579.

Ke, X., Collins, A. and Ye, S., 2002. PCR designer for restriction analysis of various types of sequence mutation. *Bioinformatics*, 18(12), pp. 1688-1989.

Keiser, J., Utzinger, J., de Castro, M.C, Smith, T., Tanner, M. and Singer, B., 2004. Urbanization in sub-saharan Africa and implication for malaria control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(2), pp. 118-127.

Knell, A.J., 1991. *Malaria: A Publication of the Tropical Programme of the Wellcome Trust*. Oxford: Oxford University Press. pp. 104.

Koekemoer, L.L., Spillings, B.L, Christian, R.N., Lo, T.C., Kaiser, M.L., Norton, R.A., Oliver, S.V., Choi, K.S., Brooke, B.D., Hunt, R.H. and Coetzee, M., 2011. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Pointe Noire, Republic of the Congo. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), pp. 1193-1200.

Koffi, A., 2003. Théories et mécanismes de résistance. Centre Pierre Richet de Bouaké Côte d'Ivoire. Cours International sur la Gestion de la Résistance des Vecteurs aux Insecticides, Yaoundé.

Korenromp, E., 2005. Malaria incidence estimates at country level for the year 2004 – Proposed estimates and draft report; *World Health Organization*, Roll Back Malaria.

Kristan, M., Fleischmann, H., della Torre, A., Stich, A. and Curtis, C.F., 2003. Pyrethroid resistance/susceptibility and differential urban/rural distribution of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s. malaria vectors in Nigeria and Ghana. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), pp. 326-332.

Kulkarni, M.A., Rowland, M., Alifrangis, M., Mosha, F.W., Matowo, J., Robert Malima, R., Peter, J., Kweka, E., Lyimo, I., Magesa, S., Salanti, A., Rau, M.E. and

Drakeley, C., 2006. Occurrence of the leucine-to-phenylalanine knockdown resistance (kdr) mutation in *Anopheles arabiensis* populations in Tanzania, detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria Journal*, [e-journal] 5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1526444/> [acedido a 15 de Maio de 2011].

Laird, M., 1988. *The Natural History of Larval Mosquito Habitats*. New Zeland: Academic Press. pp. 555.

Lanzaro, G.C., Touré, Y.T., Carnahan, J., Zheng, L., Dolo, G., Traoré, S., Petrarca, V., Vernick, K.D. and Taylor, C.E., 1998. Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in West Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, pp. 14260-14265.

Legros, F. & Danis, M., 1998. Surveillance of malaria in European Union countries. *Euro Surveillance.*, 3(5), pp. 45-47.

Lehmann, T., Hawley, W.A., Kamau, L., Fontenille, D., Simard, F. and Collins, F.H., 1996. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, 77, pp. 192-208.

Lehmann, T., Licht, M., Elissa, N., Maegga, B.T.A, Chimumbwa, J.M., Watsenga, F.T., Wondji, C.S., Simard, F. and Hawley, W.A., 2003. Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa; *Journal of Heredity*, 94 pp. 133-147.

Lehmann, T. & Diabaté, A., 2008. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), pp. 737-746.

Li, C.C., Weeks, D.E. and Chakravarti, A. 1993. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Human Heredity*, 43(1), pp. 45-52.

Lines, J.D. & Nassor, N.S., 1991. DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. *Medical and Veterinary Entomology*, 5(3), pp. 261-265.

Loiselle, B. A., Sork, V.L., Nason, J. and Graham, C., 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82(11), pp. 1420-1425.

- Malcolm, C.A., Bourguet, D., Ascolillo, A., Rooker, S.J., Garvey, C.F., Hall, L.M.C., Pasteur, N., and Raymond, M., 1998. A sex-linked *Ace* gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology*, 7(2), pp. 107-120.
- Mathias, D.K., Ochomo, E., Francis Atieli, F., Ombok, M., Bayoh, M.N., George Olang, D., Muhia, D., Kamau, L., Vulule, J.M., Mary J Hamel, M.J., Hawley, W.A., Walker, E.D. and Gimnig, J.E., 2011. Spatial and temporal variation in the *kdr* allele L1014S in *Anopheles gambiae* s.s. and phenotypic variability in susceptibility to insecticides in Western Kenya. *Malaria Journal*, 10(10).
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D., 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.. *Insect Molecular Biology*, 7(2), pp. 179-184.
- Ministério da Saúde de Angola, 2007. Plano Estratégico Nacional para o controlo da Malária em Angola 2008-2012. *Ministério de Saúde de Angola*, pp. 72.
- Morena, S., Fortes, F., Guimarães, K., Jorge, C., Ferreira, C. Lutumba, A., Sebastião, N. and Saraiva, N., 2002. The Malaria Larvae Control Experience – The use of the biolarvicides. *Ministério da Saúde de Angola*, pp. 27.
- Mori, A., Tomita, T., Hidoh, O., Kono, Y. and Severson, D.W., 2001. Comparative linkage map development and identification of an autosomal locus for insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Molecular Biology*, 10(3), pp. 197-203.
- Morrison, A.C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T.W. and Rosenberg, R., 2008. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector. *PLoS Medicine*, [e-journal] 5(3). Disponível em: <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0050068> [acedido a 23 de Julho de 2011].
- Mullen, G.R. & Durden, L., 2009. *Medical and veterinary entomology*. 2nd Edition. London: Academic Press. pp. 637.

Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. & Fournier, D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), pp. 5922-5926.

N'Guessan, R., Darriet, F., Guillet, P., Carnevale, P., Traore-Lamizana, M., Corbel, V., Koffi, A.A. and Chandre, F., 2003. Resistance to carbosulfan in field populations of *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire based on reduced sensitivity acetylcholinesterase. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1), pp.19-25.

Oduola, A. O., Idowu, E.T., Oyebola, M.K., Adeogun, A. A., Judith B Olojede, J.B., Otubanjo, O.A. and Awolola, T.S., 2012. Evidence of carbamate resistance in urban populations of *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes resistant to DDT and deltamethrin insecticides in Lagos, South-Western Nigeria. *Parasites & Vectors*, [e-journal] 5. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/116/> [acedido a 13 de Junho de 2012].

Oliveira, E., Salgueiro, P., Palsson, K., Vicente, J.L., Arez, A. P., Jaenson, T.G., Caccone, A. and Pinto, J., 2008. High Levels of Hybridization between Molecular Forms of *Anopheles gambiae* from Guinea Bissau. *Journal of Medical Entomology*, 45(6), pp. 1057-1063.

OMS/UNICEF, 2003. *Relatório sobre o paludismo em África*. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_MAL_2003.1093_por.pdf [acedido a 6 de Abril de 2011].

Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. and Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), pp. 535-538.

Pates, H. & Curtis C., 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*, 50, pp. 53-70.

Pennetier, C., Constantini, C., Corbel, V., Licciardi, S., Dabiré, R.K., Lapied, B., Handre, F. and Hougard J.M., 2009. Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: efficacy and behavioural response of natural free-flying *An. gambiae*

mosquitoes. *PloS One*, [e-journal] 4(11). Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007896> [acedido a 23 de Julho de 2011].

Pennetier, C., Corbel, V., Boko, P., Abibatou, O., N'Guessan, R., Lapied, B. and Hougard, J.M., 2007. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, [e-journal] 6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1851015/> [acedido a 23 de Julho de 2011].

Phillips, R.S., 2001. Current Status of Malaria and Potential for Control. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), pp. 208-226.

Pinto, J., Lynd, A., Elissa, N., Donnelly, M.J., Costa, C., Gentile, G., Caccone, A. and do Rosário, V.E., 2006. Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(1), pp. 27-32.

Pinto, J., Lynd, A., Vicente, J. L., Santolamazza, F., Randle, N. P., Gentile, G., Moreno, M., Simard, F., Charlwood, J. D., do Rosário, V. E., Caccone, A., della Torre, A. and Donnelly, M. J., 2007. Multiple origins of knockdown resistance mutations in the Afrotropical mosquito vector *Anopheles gambiae*. *PLoS One*, [e-journal] 2(11). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2080755/> [acedido a 5 de Abril de 2011].

Ramirez, J.L., Garver, L.S. and Dimopoulos, G., 2009. Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control. *Current Molecular Medicine*, 9(2), pp. 116–30.

Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J. and Collins, F.H., 2000a. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9(5), pp. 491-497.

- Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Prapanthadara, L., Hemingway, J. and Collins, F.H., 2000b. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 9(5), pp. 499-507.
- Reimer, L. J., Tripet, F., Slotman, M., Spielman, A. and Lanzaro, G. C., 2005. An unusual distribution of kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Molecular Biology*, 14(6), pp. 683-688.
- Ribeiro, H. & Ramos, H.C.R., 1995. *Guia ilustrado para a identificação dos mosquitos de Angola (Diptera-Culicidae)*. Volume 4. Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia. pp. 287.
- Richards, O.W. & Davies, R.G., 1997. *Imm's General Textbook of Entomology – Classification and Biology*. 10th Edition, Vol. 2. New York: Chapman & Hall.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, pp. 103-06.
- Rozendaal, J. A., 1997. *Vector control methods for use by individuals and communities*. Geneva: World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/whopes/resources/vector_rozendaal/en/ [acedido a 3 de Outubro de 2011].
- Ruppert, E.E. & Barnes, R.D., 1996. *Zoologia dos Invertebrados*, 6^{ed}. Editora Roca Ltda SP, Brasil. pp. 1029.
- Sabatinelli, G., Ejov, M. and Joergensen, P., 2001. Malaria in the WHO European Region (1971-1999). *Euro Surveillance*, 6(4), pp. 61-65.
- Santolamazza, F., Calzetta, M., Etang, J., Barrese, E., Dia, I., Caccone, A., Donnelly, M. J., Petrarca, V., Simard, F., Pinto, J. and della Torre, A., 2008. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malaria Journal*, [e-journal] 7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445265> [acedido a 6 de Maio de 2011].

Scott, J.A., Brogdon, W.G., Collins, F.H., 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49 (4), pp. 520-529.

Sermwittayawong, N., Singh, B., Nishibuchi, M., Sawangjaroen, N., and Vuddhakul, V., 2012. Human Plasmodium knowlesi infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. *Malaria Journal*, [e-journal] 11(36). Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/11/1/36> [acedido a 12 Março de 2012].

Service, M.W. & Townson, H., 2002. The *Anopheles* vector. In Warrel, D.A. & Gilles, H.M., 4th Edition (2002). *Essential Malariology*. London: Hodder Arnold. pp. 348.

Service, M.W., 1980. *A Guide to Medical Entomology*. 1st Edition. London: The Macmillan. pp. 248.

Service, M.W., 1986. *Lecture Notes on Medical Entomology*. London: Blackwell Science Ltd. pp. 272.

Service, M.W., 1993a. The *Anopheles* vector. In Gilles, H.M. & Warrel, D.A., 3rd Edition (1993). *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. London: Hodder Arnold. pp. 97-123.

Service, M.W., 1993b. Mosquitoes (Culicidae) In Lane, R.P. & Crosskey, R.W., 1st Edition (1993). *Medical Insects and Arachnids*. London: Chapman & Hall. pp. 120-240.

Service, M.W., 2008. *Medical entomology for students*, 4th Ed. Cambridge University Press, pp. 306.

Snow, R.W. & Gilles, H.M., 2002. The epidemiology of malaria. In Warrel, D.A. & Gilles, H.M., 4th Edition (2002). *Essential Malariology*. London: Hodder Arnold.

Soderlund, D.M. & Knipple, D.C., 1999. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism. *Annals of the Entomological Society of America*, 92(6), 909-915.

Soderlund, D.M. & Knipple, D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6), pp. 563-577.

Soderlund, D.M., 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In Sjut, V., Volume 13 (1997). *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals*. Berlin: Springer. pp. 21-56.

Stump, A.D., Atieli, F.K., Vulule, J.M. and Besansky, N.J., 2004. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(6), pp. 591-596.

Sutherland, C.J., Tanomsing, N., Nolder, D., Oguike, M., Jennison, C., Pukrittayakamee, S., Dolecek, C., Hien, T.T., do Rosário, V.E., Arez, A.P., Pinto, J., Michon, P., Escalante, A.A., Nosten, F., Burke, M., Lee, R., Blaze, M., Otto, T.D., Barnwell, J.W., Pain, A., Williams, J., White, N.J., Day, N.P.J., Snounou, G., Lockhart, P.J., Chiodini, P.L., Imwong, M., and Polley, S.D., 2010. Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(10), pp. 1544-1550.

Swaroop, S., 1968. *Méthodes statistiques utilisables dans les campagnes d'éradication du paludisme*. Série de Monographies, N° 51. Genève: Organisation Mondiale de la Santé. pp. 163.

Tabachnick, W.J., 2003. Reflections on the *Anopheles gambiae* genome sequence, transgenic mosquitoes and the prospect for controlling malaria and other vector borne diseases. *Journal of Medical Entomology*, 40(5), pp. 597-606.

Trape, J., Lefebvre-Zante, E., Legros, F. G. N, Bouganali, H., Druilhe, P. and Salem, G., 1992. Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(2), pp. 181-189.

Tsy, J.M.L., Duchemin¹, J.B., Marrama, L., Rabarison, P., Goff¹, G., Rajaonarivelo, V. and Robert, V., 2003. Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex

and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria Journal*, [e-journal] 2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269986/> [acedido a 17 de Setembro de 2011].

Turner, T.L., Hahn, M.W. and Nuzhdin, S.V., 2005. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, [e-journal] 3(9). Disponível em: <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0030285> [acedido a 17 de Setembro de 2011].

Van de Castele, T., Galbusera, P. and Matthysen, E., 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, 10(6), pp. 1539-1549.

Wallace, P. & Geoffrey, P., 2002. *Tropical Medicine and Parasitology*. 5th Edition. London: Mosby. pp. 334.

Wang, J., 2002. An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers. *Genetics*, 160, pp. 1203-1215.

Warrell, D.A. & Gilles, H.M., 2002. *Essential Malariology*. 4th Edition. London: Hodder Arnold. pp. 384.

Weetman, D., Wilding, C.S., Steen, K., Pinto J. and Donnelly, M.J., 2012. Gene flow-dependent genomic divergence between *Anopheles gambiae* M and S forms. *Molecular Biology and Evolution*, 29(1), pp. 279-291.

Weill, M., Chandre, F., Brengues, Manguin, S., Akogbeto, Pasteur, M.N., Guillet, P. and Raymond, M., 2000. The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology*, 9(5), pp. 451-455.

Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N. and Raymond, M., 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is nonhomologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 269, pp. 2007-2016.

Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P. and Raymond, M., 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Natura*, 423, pp. 137-138.

Weill, M., Malcolm, F., Chandres, F., Mogensen, K., Berthomieu, M., Marquine, M., and Raymond, M., 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vector. *Insect Molecular Biology*, 13(1), pp. 1-7.

White, B.J., Cheng, C., Simard, F., Costantini, C., and Besnky, N.J., 2010. Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, 19(5), pp. 925–939.

White, G.B., 1985. *Anopheles bwambae* sp.n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An.gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 10(4), pp. 501-522.

White, G.B., 2003. Medical acarology and Entomology – Appendix IV. In Cook, G. & Zumla, A., 22nd Edition (2008). *Manson's Tropical Diseases*. UK: Saunders Ltd. pp. 1717-1805.

White, N.J., 2003. Protozoan Infections – Section 10. In Cook, G. & Zumla, A., 22nd Edition (2008). *Manson's Tropical Diseases*. UK: Saunders Ltd. pp. 1205-1295.

WHO, 1963. *Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs: Treizième rapport du comité d'experts des insecticides*. Technical report series, N° 265. Genève: Organisation Mondiale de la Santé.

WHO, 2001. *Action Plan for the Reduction of Reliance on DDT in Disease Vector Control*. Geneva: World Health Organization. pp. 41.

WHO, 2006. WHO gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr50/en/> [acedido a 6 de Abril de 2011].

WHO, 1998. Tests Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces. Report of the WHO Informal Consultation. Geneva, pp. 46.

WHO, 2011. World Malaria Report 2011. Disponível em: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ [acedido a 15 de Janeiro de 2011].

Yawson, A.E., McCall, P.J., Wilson, M.D. and Donnelly, M.J., 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Medical and Veterinary entomology*, 18(4), pp. 372-377.

Zheng, L., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Collins, F.H. and Kafatos, F.C., 1996. An Integrated Genetic Map of the African Human Malaria Vector Mosquito, *Anopheles Gambiae*. *Genetics*, 143, pp. 941-952.

Sites consultados:

http://in-silico.net/tools/statistics/fisher_exact_test/2x3; acedido em Abril de 2012.

<http://www.wumcd.org/mosquito/lifecycle.html>; acedido em Março de 2012.

<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>; acedido em Abril de 2012.

<http://www.virtual.unifesp.br>; acedido em Maio de 2012.

<http://www.cdc.gov>; acedido em Janeiro de 2012.

<https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook>; acedido em Agosto de 2012.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da malária a nível mundial.	2
Figura 2. Ciclo de Vida do <i>Plamodium</i> sp.....	4
Figura 3. Ciclo de Vida de um mosquito (Diptera: Culicidae).....	6
Figura 4. Quadro com as principais diferenças a nível dos ovos, larvas e posição de repouso dos adultos entre mosquitos da subfamílias Anophelinae e Culicinae.	8
Figura 5. Representação esquemática dos quatro domínios do canal de sódio..	15
Figura 6. Mapa de Angola com diferentes extractos epidemiológicos.....	20
Figura 7. Fotografia de um gel de agarose (2%) contendo os produtos da reacção de PCR-RFLP para identificação das espécies e formas moleculares do complexo <i>An. gambiae</i>	26
Figura 8. Fotografia do gel de agarose a 2% para a detecção da mutação G119S na sequência <i>ACE-1</i> em <i>An. gambiae</i> s.s.	30
Figura 9. Fotografia do gel de agarose a 3% para detecção do alelo <i>kdr</i> em <i>An. gambiae</i> s.s.	33
Figura 10. Electroferograma de um indivíduo <i>Anopheles gambiae</i> s.s.....	36
Figura 11. Taxas de mortalidade para os ensaios de susceptibilidade a insecticidas realizados em 2009 e 2010.....	41
Figura 12. Distribuição de alelos <i>kdr</i> em amostras resistentes e sensíveis para insecticidas piretróides e DDT em 2009.....	44
Figura 13. Proporção de classes de <i>pedigree</i> determinadas pelo programa ML-RELATE para as amostras de <i>An. Gambiae</i> s.s. de Luanda.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados na amplificação da região IGS do rDNA.....	27
Tabela 2. Composição da mistura de reacção para amplificação da região IGS do rDNA.	27
Tabela 3. Condições de amplificação da região do rDNA de <i>An. gambiae s.l.</i>	28
Tabela 4. Composição da mistura de reacção para a restrição do produto amplificado da região IGS do rDNA.	28
Tabela 5. Composição das misturas de reacção de PCR para a detecção da mutação G119S na sequência <i>ACE-1</i> em <i>An. gambiae s.s.</i>	29
Tabela 6. Composição das misturas de reacção da digestão enzimática para a detecção da mutação G119S na sequência <i>ACE-1</i> em <i>An. gambiae s.s.</i>	30
Tabela 7. Composição da mistura de reacção de PCR para detecção da mutação <i>kdr</i> L1014S.....	31
Tabela 8. Programa de ciclos de PCR para a detecção da mutação <i>kdr</i> L1014S.....	31
Tabela 9. Composição das misturas de reacção, de restrição enzimática, para a detecção da mutação <i>kdr</i> L1014S.	32
Tabela 10. Composição das misturas de reacção de PCR para a detecção da mutação <i>kdr</i> L1014F.	322
Tabela 11. <i>Loci</i> microssatélites de <i>An. gambiae</i> analisados.	34
Tabela 12. Composição da mistura de reacção de amplificação dos <i>loci</i> microssatélites.	35
Tabela 13. Programas de ciclos de PCR dos <i>loci</i> microssatélites.....	35
Tabela 14. Número de mosquitos analisados molecularmente, por ano, insecticida e fenótipo de resistência.	42
Tabela 15. Frequências alélicas e genótípicas para o <i>locus kdr</i> de <i>An. gambiae s.s.</i> em Luanda.	43

Tabela 16. Estimativas de diversidade genética para os 11 *loci* microssatélites de *An. gambiae* s.s. em Luanda..... 45

Tabela 17. Estimativas de coeficientes de parentesco em amostra de *An. gambiae* s.s. de Luanda. 46

ANEXOS



Figura A. Recolha de larvas e pupas de mosquitos.

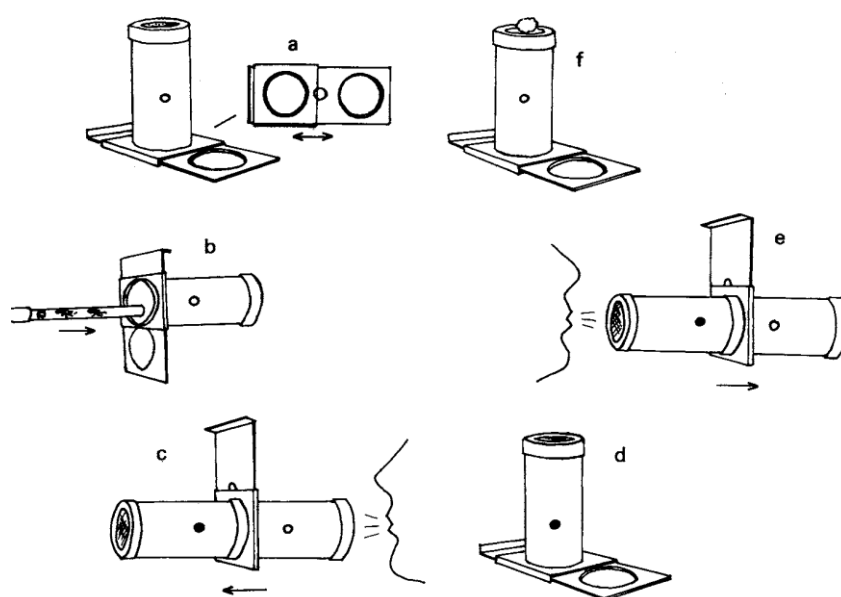


Figura B. Kit da OMS para testes de susceptibilidade de adultos a insecticidas. a: Peça em forma de guilhotina que se pode abrir ou fechar. b: Transferência de mosquitos para o tubo sem insecticida (tubo de repouso). c: Transferência de mosquitos para o tubo com insecticida (tubo de exposição). d: Período de exposição. e: Transferência de mosquitos para o tubo de repouso. f: período de repouso de 24 horas, após o qual se realiza a leitura do teste (adaptado de Koffi, 2003).

Composição dos reagentes:

Tampão de lise para extração de DNA

	[inicial]	[final]
Água MilliQ (estéril)	-	-
Tris-HCl, pH 8.0	0.5M	100mM
NaCl	0.5M	50mM
EDTA, pH 8.0	0.5M	50mM
Espermina	15mM	0.15mM
Espermidina	50mM	0.5mM
SDS	10%	0.03%
Proteinase K	20mg/ml	0.01mg/ml

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X: Ácido Bórico - 55.03 g/L (0.89 M); EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 7.44 g/L (0.02 M); Tris - 107.81 g/L (0.89 M).